

GOVP1200015859

제 일 단계
최종보고서

감염방어 및 면역기전

Defence from Infection and Immunogenic
Mechanisms

Recombinant Poliovirus Vector를 이용한 AIDS Vaccine 개발 기초연구

Basic Study of AIDS Vaccine Development using
Recombinant Poliovirus Vector

연구기관
한남대학교

과 학 기 술 처

제 출 문

과 학 기 술 처 장 관 귀하

본 보고서를 “감염 및 방어기술 연구”중 세부과제
“Recombinant poliovirus vector를 이용한 AIDS vaccine 개발
기초연구”의 최종 보고서로 제출 합니다.

1997. 7월 7일

주관연구기관명 : 한남대학교

세부연구책임자 : 배 용 수

요 약 문

제목: Recombinant poliovirus vector를 이용한 AIDS vaccine 개발 기초연구

연구개발의 목적 및 필요성 : AIDS의 확산이 기존의 이론과는 달리 주로 일반 감염자들의 heterosexual transmission(mucosal transmission)에 의해 전파된다는 사실이 확인되면서 AIDS vaccine 개발에 공통적으로 mucosal immunity의 효과적인 유도가 강조되고 있는 가운데 본 연구자는 mucosal immunity 유도능이 강하고 안전성이 잘 알려진 poliovirus Sabin strain을 AIDS vaccine 생산을 위한 vector로 개발하고 이의 vaccine vector 가능성을 알아보고자 하였다.

연구개발의 내용 및 범위 : Poliovirus Sabin strain cDNA를 유전자 조작하여 multiple cloning site와 protease cutting site를 갖는 poliovirus vector를 개발하고 여기에 vaccine 가능 단백을 cloning 하여 vaccine 유전자를 쉽게 cloning 할 수 있는 multiple cloning site와 이곳에 삽입된 vaccine 유전자가 poliovirus 증식과 함께 발현될 때 vaccine 단백질이 viral-specific protease에 의해 잘려나와 poliovirus 증식 부위에서 면역을 유도 할 수 있도록 protease-specific cutting site를 새로이 도입한 poliovirus Sabin vector를 개발을 시도 하였으며, 이 vector를 이용하여 HIV-1 p24 를 발현하는 chimeric poliovirus를 합성함으로써 새로이 개발한 viral vector의 실용 가능성을 확인하고자 하였다.

연구개발결과 : Sabin poliovirus cDNA를 유전자조작하여 long polyprotein의 N-terminal 부위와 VP3/VP1 junction 부위에 각각 multiple cloning site와 poliovirus 3C-protease cutting site를 새로이 도입한 recombinant cDNA를 만들고 이를 in vitro transcription 및 HeLa cell transfection 과정을 거쳐 recombinant poliovirus를 생산하는데 성공하였다. 이 recombinant poliovirus(PVS-3m and PVS-4m)는 10번이상의 계대배양에도 sequence 상의 변화없이 안정하였으며 야생의 Sabin strain과 replication capacity를 비교하여 볼 때 3m은 wild type과 유사하였으며 4m은 약간 떨어지는 것이 관찰 되었다. 다음으로 PVS-3m cDNA의 새로 도입한 multiple cloning site에 HIV-1 p24 유전자의 N-말단 169개의 아미노산을 cloning 하고 RNA를 합성하여 Hela cell에 transfection 하여 chimeric poliovirus를 생산하였으며 이 chimeric virus를 감염시킨 세포에서 p24 단백질이 매우 효과적으로 발현됨을 western blot으로 확인 하였다. 또한 동일 기간에 p24를 BCG에도 발현시켜 실험동물에서 면역유도능을 조사한 바 제조합 BCG를 이용한 mucosal vaccine 개발 가능성도 밝혔다.

연구개발결과의 활용계획 : 일단계 연구에서 개발한 vector를 이용하여 2단계 연구로 HIV-1의 principal neutralizing domain으로 잘 알려진 env 의 V3 부위를 AIDS 환자의 escape mutant에서 dominant 하게 나타나는 sequence로 유전자 조작하여 multivalent V3-concatamer를 만들고 이를 poliovirus vector의 multiple cloning site에 도입하여 mucosal AIDS vaccine 으로 사용가능한 chimeric viral vaccine 개발의 기반을 마련코자 한다

SUMMARY

Recently, mucosal immunity has been strongly emphasized by scientists and policy-makers for an ideal AIDS vaccine, because the large portions of AIDS spreading in these days are believed to be due to the heterosexual transmission(mucosal transmission) by normal HIV-1 positive patients rather than homosexual men or drug-users. Following the currency, we have tried to develop a poliovirus vaccine vector with poliovirus Sabin strain, which is well known for its safety and mucosal immunity in human, as a first step of AIDS vaccine development. A multiple cloning site and poliovirus-specific 3C-protease cutting site were newly introduced into the N-terminal or VP3/VP1 junctional site of long polyprotein in Poliovirus Sabin cDNA. RNAs transcribed from the manipulated cDNA were transfected into HeLa cells, resulting in production of recombinant progeny viruses(PVS-3m and PVS-4m). PVS-3m virus showed similar replication capacity to that of wild type Sabin, whereas the PVS-4m showed about one magnitude lower than that of wild type. HIV-1 p24 was cloned into the multiple cloning site of PVS-3m to elucidate the utility of the novel vector. Chimeric poliovirus produced from the transfection of recombinant RNA synthesized p24 efficiently during the replication in HeLa cells, suggesting that the vector can be used for vaccine development. We are going to use this vector to develop live AIDS vaccine by introducing multivalent V3-concatamer, whose sequences will be adjusted to those of dominant HIV-1 escape mutants in AIDS patients, into the multiple cloning site of the vector.

CONTENTS

1. Introduction-----	7
2. Background-----	9
3. Methods and Results-----	28
4. Accomplishment and Contribution-----	57
5. Application of the Results-----	60
6. Reference-----	61

목 차

제 1 장 서 론	7
제 2 장 국내외 기술개발 현황	9
1절. AIDS vaccine 개발의 동향	9
2절. Mucosal immunity	12
3절. Mucosal Immunity를 효과적으로 유도하는 AIDS vaccine 개발	13
4절. Poliovirus vaccine vector	17
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	28
1절. 연구수행 내용	28
2절. 연구수행 결과	36
제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도	57
제 5 장 연구개발 결과의 활용	60
제 6 장 참고문헌	61

제 1장 서 론

최근 생명과학분야의 과학자들과 정책입안자들이 제시한 이상적인 AIDS vaccine의 기준(7,25)을 보면 공통적으로 mucosal immunity의 효과적인 유도를 강조하고있다. 이는 현재 전세계적으로 급속히 확산되고 있는 AIDS 환자가 수혈이나 동성연애, 약물중독 등 피에 의한 전염보다는 대다수가 heterosexual transmission에 의해 감염된 자들로, HIV-1이 상처를 통하지 않고도 생식기 주위에 널리 분포되어 있는 점막조직을 통해 감염될 수 있다는 것이다. 이러한 요구에 부응하여 Andino 등(1)은 poliovirus 를 vector로 이용한 새로운 mucosal vaccine system을 연구 발표하였다. 이는 기존의 subunit vaccine이나 vaccinia virus를 이용한 virual vaccine의 여러가지 한계를 해결할 수있는 매우 가능성있는 model로 받아들여지고있다. 그러나 이들은 poliovirus의 wild type인 Mahoney strain을 vector로 개발하여 실험에 사용하였기에 mucosal immunity를 유도하는데는 좋은 결과를 얻었지만 실험동물이 neuronal disease로 사망하여 후속 실험들을 지속할 수 없었다. 본 실험실에서는 mahoney strain 대신 poliovirus의 vaccine strain중 가장 안전한 것으로 잘 알려진 Sabine strain을 vector로 개발하고 Andino 등과 비슷한 실험을 수행함으로써 recombinant virus를 이용한 AIDS vaccine 개발의 가능성을 조사해보고자 하였다. 경구 투여용

poliovirus vaccine (Sabin)은 mucosal immunity를 효과적으로 유도하여 poliovirus 감염을 예방하는 viral vaccine으로 잘 알려져 있다. 이 poliovirus Sabin 1 strain의 cDNA를 vector로 개발하여 원하는 vaccine 후보 유전자를 여기에 cloning 하고 in vitro에서 transfection 하여 chimeric virus를 만든 다음 이를 경구투여용 vaccine으로 사용한다면 vaccine 단백질에 대한 mucosal immunity를 효과적으로 유도해 낼 수 있을 것이다. AIDS vaccine 개발의 가장 큰 문제점은 역시 env gene variation에 의한 escape mutant 생성일 것이다. 이 문제의 해결점 모색의 일환으로 본 연구에서는 우리나라 AIDS 환자의 env variation을 조사하기 위해 random primer를 합성하여 env library를 만들고 AIDS 환자의 혈청으로 env gene 중 V3 부분의 sequence variation을 조사해 앞으로 이 부분에 대한 vaccine 개발의 기초자료로 삼고자 하였다.

제 2장 국내외 기술개발 현황

제 1절. AIDS vaccine 개발의 동향

최근 생명과학분야의 과학자들과 정책입안자들이 제시한 이상적인 AIDS vaccine의 기준을 보면 다음과 같다(28). 첫째, 안전해야 한다. 둘째, vaccine을 투여 받은 사람들 거의 모두 면역이 유도되어야 한다. 셋째, 세포성 면역과 체액성 면역을 동시에 유도해야 한다. 넷째, 효능이 오랫동안 지속되어야 한다. 다섯째, 여러 HIV-1 subtype에 대해서도 효과가 있어야 한다. 여섯째, 비뇨생식기 등 주요 AIDS 전파 경로에 점막성면역(mucosal immunity)을 유도해야 한다. 일곱번째, 경제성이 있어야 한다. 또한 최근 제시된 안전하고 효과적인 AIDS vaccine의 이상적 model에 따르면 AIDS vaccine은 다음 조건들을 갖추어야 한다(8). 첫째, 전신성 면역뿐 아니라 국부적 점막면역(local mucosal immunity)을 유도해야 한다. 둘째, 입, 직장(rectum), 생식기 주위에 있는 점

막부위에 IgA 항체를 충분히 유도할 수 있어야 한다. 셋째, 도움 T 세포에 의한 면역, 특히 Th1에 의한 세포성면역과 함께 Th2에 의한 점막면역 유도가 용이해야 한다. 넷째, cytotoxic T 세포(CTL) 반응을 잘 유도해야 한다. 다섯째, 여러 AIDS virus subtype에 효과가 있어야 한다. 이 두가지 기준 모두에서 볼 수 있듯이 AIDS vaccine 개발의 경우 mucosal immunity를 강조하고 있다.

이와같이 최근들어 AIDS vaccine 개발에 mucosal immunity가 강조되고 있는 것은 다음과 같은 역학조사 및 연구결과 때문일 것이다. 이제까지 AIDS는 약물중독자들의 주사기 공용을 통해, 그리고 동성연애자들과 감염된 피의 수혈에 의해서 전염되는 것으로 알려져 왔다. 그리고 유럽과 미국의 AIDS 환자의 경우 많은 부분이 약물중독 혹은 동성연애자들인 것도 사실이다. 그러나 최근 동남아 지역에서 퍼져나가고 있는 AIDS 환자의 경우 많은 부분이 이성간의 성관계에 의한 전염(heterosexual transmission)인 것을 볼때 AIDS 전파가 피에 의한 전염뿐 아니라 점막세포에 의한 전염(mucosal transmission)도 매우 중요하게 작용한다고 생각하게 되었다(53). 다시 말하면 HIV-1에 양성반응을 보인 환자와 성관계를 가질 경우 비뇨생식기 주위의 mucosal area에 많이 존재하는 langerhans 세포나 dendritic 세포가 HIV에 감염되고 이것이 mucosal immunity를 유도하는 동안 dendritic 세포에 감염된 T helper 세포에 HIV가 전달되어 결국 AIDS를 유발한다는 것이다. 이에 대한 간접적 증거로

langerhans 세포나(57) dendritic 세포가 HIV-1에 잘 감염된다는 사실이 여러차례 보고되었는가하면(29,44,45), AIDS 환자의 lymph node에서 dendritic 세포를 중심으로 HIV 증식이 일어나는 것으로 보아 이들 세포가 AIDS 발병기작에 매우 중요한 것이라는 연구결과가 최근 수차례 발표되었다(7,17,19,43). 또한 mucosal transmission에 대한 동물 실험증거로 Macaque 원숭이의 음성 생식기나 자성 질에 SIV를 처리할 경우 이들 원숭이가 쉽게 virus에 감염된다는 사실이 밝혀졌다(37,38). 이와 관련하여 1996년 현재 우리나라 AIDS 감염자 527명중 99명이 동성연애자인 반면 대다수인 363명이 이성간의 성접촉에 의해 감염된 환자(감염발생 정보지 1996년 4월호)인 점을 고려해 보더라도 mucosal transmission이 AIDS 전파에 주요인임을 추측해 볼 수가 있다. 이런 여러 현상들로 미루어 보아 앞으로 개발될 AIDS vaccine은 무엇보다도 mucosal immunity를 잘 유도하여야 한다는 점을 아무리 강조해도 지나치지 않을 것이다. 최근까지 수많은 질병들에 대해 vaccine이 개발되어왔지만 실재 이러한 vaccine중 mucosal immunity를 고려한 vaccine 개발은 거의 전무한 실정이다. 그럼에도 불구하고 이런 vaccine들에 의한 총체적 면역(systemic immunity) 유도로 기관지나 장내 병원성질환을 충분히 방어할 수 있었다. 그러나 HIV-1의 경우 기존의 vaccine과 달리 mucosal immunity 유도를 고려하지 않는다면 vaccine으로서의 효과를 거두기가 힘들 것이다.

제 2 절 . Mucosal Immunity

사람의 몸속에는 공통된 점막 면역체계 (common mucosal immune system :CMIS)가 존재하며 이것에 의해 체내 전체 점막과 점막부위 및 유출성 임파절(drawing lymph node)과 점막 관련 임파조직(lymphoid organ)의 면역이 이루어진다. 그러므로 어느 한 곳의 면역이 유도되면 다른 위치의 점막에도 면역반응이 나타나게 된다. 특히 편도선(tonsil)이나 Peyer's patches 등과 같은 점막연관 임파조직(mucosa-associated lymphoid tissue)들이 점액성 면역유도에 핵심적으로 작용한다는 것은 주지의 사실이다. 또한 점액부위에서는 특이한 형태의 microfold 세포(M cells)가 임파조직을 덮고 있어 이들 작용에 의해 점막 관상조직(lamina) 외부의 항원을 점막 안쪽의 B 임파구나 macrophage 혹은 dendritic cell같은 강력한 antigen presenting cell에 효과적으로 전달해줌으로 mucosal immunity를 일으키게 되는데, 이때 특히 dendritic cell의 경우 항원을 전달받으면 interdigitating dendritic cell 모양으로 바뀌어 임파절(lymph node)로 이동한 후 임파절의 T 세포를 활성화시켜 줌으로서 세포성 면역도 유도하게 된다(20,31). 그러므로 HIV가 M 세포에 의해 mucosal area를 통과하여 dendritic cell에 전달될 경우 DC를 carrier로 하여 lymph node로 옮겨지게 되고

lymph node에 있는 휴지기의 세포가 antigen presenting cell(APC)인 DC에 의해 감염된 후 HIV-1에 감염되므로 AIDS 환자의 전기간에 걸쳐 lymph node에서는 지속적인 HIV 증식이 관찰된다는 것이다(17,19,43). B cell은 dendritic cell에 비하면 약한 APC로 세포성 면역보다는 mucosal area에 체액성 면역을 유도하는데, 이 경우 mucosal area의 macrophage가 세포를 활성화시켜 IL-5와 IL-6 합성을 촉진시키므로 mucosal area에 많이 존재하는 IgA-생성 B 전구세포의 분화를 유도하게 된다(31,39). Peyer's patch 같은 핵심적 점막 면역조직 주위에는 를 포함한 T세포와 IgA-producing B cell의 전구체가 많이 존재하는데 여기에 항원이 들어오면 IgA-생성 B 세포가 Peyer's patch에서 순환계를 거쳐 점막으로 되들어가고 이때 CMIS를 거치면서 숫자가 증가되어 lamina propria 같은 면역구조를 가지게 된다. 그러므로 lamina propria에는 세포의 수가 보다 월등히 많다.

제 3 절 Mucosal Immunity를 효과적으로 유도하는 AIDS vaccine 개발

Mucosal immunity를 유도하는 AIDS vaccine을 개발하기 위해 다음과 같은 실험이 진행되었다. cholera toxin이나 E. coli의 exotoxin 같은 mucosal immunogen을 사용할

경우 IL-2 생성과 그에 따른 세포증식이 저지되는 반면 IL-4 생성은 영향을 받지 않아 세포증식이 촉진된다(39). 결과적으로 숫자의 불균형은 여러 다른 항원에 대한 mucosal immunity를 증가시켜 주게 되므로(59) 이들 항원을 vaccine 과 함께 사용할 경우 세포성면역 보다 과량의 IgA를 생성하는 체액성 면역이 증가되게 된다(59). 이와같은 결과는 SIV-특이 mucosal immunity를 유도하는 연구에서도 잘 나타나(36) 이런 system을 HIV vaccine 개발에 도입할 경우 좋은 결과를 기대할 수도 있을 것이다. 한편 microencapsulation 방법이 개발되었는데 이는 항원을 미세 capsule에 싸서 투여하므로 mucosal area에서 흡수효과를 높이고 또 항원이 소화기관을 지날때 파괴되는 것을 막아주므로 효과적으로 mucosal immunity를 유도하는 방법이다(35). 이와같은 방법으로 만든 SIV vaccine을 전신 면역유도와 함께 소화기나 호흡기를 통해 원숭이에 주입한 후 SIV를 원숭이의 자성 생식기에 감염시킨 결과 SIV가 감염이 억제되었다(34). 그러나 이런 microsphere에 의한 vaccine 연구는 전신성면역과 점막성 면역이 조화를 이루도록 항원조합의 최적조건을 맞추어 주어야 하는 어려움이 남아있다.

무엇보다도 mucosal immunity를 가장 효과적으로 유도할 수 있는 것은 역시 mucosal area에 감염되어 특히 세포독성 임파구(cytotoxic T lymphocyte ; CTL) 생성과 함께 국부 점막면역을 유도하는 호흡기와 소화기를 통해 감염되는 virus들일 것이다. Meitin등(36)에 의한 재조합 vaccinia

virus를 사용한 influenza vaccine 연구, Rotavirus 감염 후 소장 점막표면에 rotavirus-특이 세포독성 T 임파구 (rotavirus-specific CTL)의 생성 관찰(42), 약독화된 reovirus serotype으로 장에 점막면역 유도시 Peyer's patch에 IgA-producing B cell과 virus에 특이한 CTL이 다량 유도되는 점(32), herpes simplex virus glycoprotein B를 adenovirus와 재조합하여 호흡기를 통해 면역시켰을 때 점막면역이 유도되고 Herpes simplex virus 감염이 억제되는 연구결과(21) 등 virus에 의해 mucosal immunity가 효과적으로 유도되는 것이 밝혀졌다. 그러므로 이러한 점막면역을 유도하는 virus를 vector로 개발하여 여기에 HIV subgenome을 재조합 할 경우 HIV-1에 대한 mucosal viral vaccine 개발도 가능하리라 생각된다.

Recombinant viral vaccine의 안전성과 효율성을 고려할 때 우선 vaccinia virus를 vector로하여 vaccine을 개발하려는 연구가 많이 진행되었다. Vaccinia virus는 231 kbp의 큰 genome을 가진 pox virus group의 virus로 원하는 유전자를 재조합에 의해 viral genome에 쉽게 삽입할 수 있는 장점이 있어 이미 오래전부터 유전자조작에서 vector로 상용해왔다. 이 vaccinia virus vector를 이용해 여러 group에서 HIV-1의 env 유전자를 재조합한 recombinant viral vaccine candidate를 개발하였으며(9,23), 이를 macaques 원숭이와 생쥐에 주사하여 env 유전자에 대한 면역반응과 유도되는 CTL도 각각 확인되었다(16,54). 그 후 SIV의 다른 단백질들을

vaccinia virus에 재조합하여 원숭이에서 CTL 반응을 조사하였는데 SIV의 gag 유전자와 재조합된 vaccinia virus도 원숭이에서 효과적으로 CTL을 유도한다는 사실이 밝혀졌다(52). 또한 vaccinia virus의 부작용을 줄이기 위해 HIV-1 유전자와 함께 γ -interferon을 fusion protein으로 발현시키는 연구도 진행되었다(22). 이와함께 mucosal immunity 유도를 위해 더욱 약독화된 vaccinia virus도 개발되었으나(55), 이런 약독화된 vaccinia virus를 사용하여 제조한 recombinant vaccine은 vaccine을 투여 받은 사람에게 효과적으로 면역을 유도하지 못하였다(12). 이와 같은 실험결과로 볼 때 recombinant vaccinia vaccine을 사용할 경우 다른 immunogen과 함께 booster injection을 하는 등 vaccination 과정이 더 연구되어야 할 것이며 또 아무리 약독화되었다 하여도 면역결핍 환자에게 vaccinia virus를 주입하는 것은 위험도가 높아 AIDS vaccine 개발로는 아직은 좀더 많은 연구가 선행되어야 할 것으로 생각된다. Adenovirus 감염에 매우 민감한 사람들을 위해 1970년대 초 약독화된 Adenovirus vaccine이 개발되었다(56). 이 viral vaccine도 mucosal immunity 유도능이 크다는 사실이 밝혀지면서 recombinant vaccine 개발연구에 많이 사용되어 왔는데 이도 vaccinia virus보다 작은 genome(35-38kbp)을 가지면서도 원하는 유전자의 full-length를 virus에 재조합시켜 viral vaccine을 생산할 수 있는 편리한 점 때문이다. Chanda등(10)은 Type 7 adenovirus에 HIV-1의 env 유전자를 재조합하여 이를 배양

된 세포에 감염시켜 높은 농도의 env 단백질을 합성하였으며, 이를 개에 주사하여 HIV-1 env 단백질에 특이한 매우 효과적인 체액성 면역을 유도하는데 성공하였다(41). 일차 면역 반응을 일으킨 개는 Adenovirus 4-env 재조합 virus나 env 단백질만으로도 쉽게 boosting이 되었으나 유도된 면역 반응이 세포성 면역 반응이었는지 아니면 mucosal immune 반응이었는지는 밝혀지지 않았었다. 그러나 이 adenovirus vector에 herpes simplex virus glycoprotein B를 재조합한 viral vaccine은 상당히 방어력이 높은 mucosal immunity와 herpes virus에 특이성을 나타내는 CTL을 효과적으로 유도하는 것이 확인되었다(21). 그러나 이런 human adenovirus도 전염성이 강한 DNA tumor virus로 결막염, 각막염 등 인체에 여러가지 질병을 일으키므로 이것을 면역이 결핍된 환자에게 투여할 vaccine 개발의 viral vector로 사용할 경우 먼저 안정성의 문제가 해결되어야 할 것이다.

제 4 절 Poliovirus Vector

Poliovirus는 7,400여개의 염기로 구성된 (+)-sense ss-RNA virus로 유전자가 L-4-3-4 구조를가지는 전형적인 picornavirus 이다 (Fig. 1). 다른 picornavirus와 같이 이 virus도 숙주세포에 감염되면 viral genome이 mRNA로 작용하여 먼저 하나의 긴 polyprotein을 만들고 이것이 viral

specific protease에 의해 processing 되면서 Leader peptide(L) 외에 4개의 구조단백{VP1, VP3, VP0(VP4 and VP2)}과 RNA polymerase(3D), protease(3C) 등의 기능성 단백을 만들고 polymerase의 작용에 의해 genome replication 이 있는 후 숙주세포의 cytoplasm에서 assembly가 일어나며 이어 숙주세포를 파괴하고 progeny virus가 생산된다 (Fig. 2). Poliovirus는 picornavirus 중에서도 enterovirus로 영장류의 소화기관을 통해 감염되며 야생형의 경우 신경세포에서 증식하여 중추신경계를 손상시킴으로 poliomyelitis를 일으킨다. 이 전염성이 강한 야생형 poliovirus의 감염방지를 위해 3가지 약독화된 poliovirus vaccine strain (Sabin type 1, type2, type 3)이 개발되어 전세계적으로 사용되고있다. 이 vaccine strain 들은 야생형에 비해 neurotropism이 없어 장(intestin)에 서만 감염 증식되고 신경세포에는 감염되지않아 효과적으로 mucosal immunity를 유도하면서도 poliomyelitis를 유발하지 않는다. 그러나 이 중 Sabin type 2와 type 3는 매우 낮은 빈도이기는 하지만 poliomyelitis를 유발하는 것이 보고되어있다. 반면, Sabin type 1 strain은 아직까지 한번도 부작용의 예가 보고된 적이 없는 안전한 vaccine 으로 알려져 있으므로, 이 type 1 strain을 다른 vaccine 개발의 viral vector로 이용할 경우 투여도 간단하고 면역유도능도 뛰어나며 부작용도 없어 live viral vaccine으로서 좋은 효과를 기대할 수 있을 것이다.

Poliovirus는 비록 RNA virus이기는 하지만 genome

size도 작고 구조도 간단한대다, 1981년 Racanielo와 Baltimore (49)에 의해 infectious cDNA clone이 합성되면서 gene manipulation이 가능하게 되자 여러 가지 분자생물학적인 연구를 통해 유전자의 구조와 subgenome들의 기능이 계속적으로 밝혀지게 되었다 (Fig.1). 그 후 Kohara 등(26)은 Sabin type 1 strain의 cDNA를 합성하여 여기에 SV40 replication 및 transcription signal을 넣은 감염성이 높은 cDNA clone을 개발하므로써 경구투여용 polio vaccine 대신 gene vaccine의 가능성을 제시하였다. 그러나 이 실험결과는 poliovirus gene vaccine 보다는 poliovirus cDNA를 vector로 이용한 recombinant chimeric viral vaccine 개발에 더 많이 이용되어 왔다.

Poliovirus를 이용한 vector 개발은 크게 3 부류로 나누어 진행되고있다 (Fig.3). 첫째는 poliovirus의 major outercapsid protein인 VP1의 immunogenic epitope일부를 foreign peptide 유전자와 치환하여 chimeric virus를 만드는 방법으로(Fig.3a) 주로 영국 University of Reading의 J.W. Almond group을 중심으로 진행되었으며, 두번째는 capsid protein의 일부 혹은 전체를 제거하고 여기에 vaccine 유전자를 삽입한후 이를 capsid protein 발현 vector와 co-transfection 하여 minireplication을 합성하고 이를 vaccine으로 개발하려는 연구로(Fig.3b) University of Alabama의 C.D. Morrow group에서 진행중이며, 세번째는 vaccine 유전자를 poliovirus cDNA에 cloning 할때

poliovirus-specific protease의 recognition site를 viral cDNA의 cloning site에 도입하여 virus의 감염 및 증식에는 별 손상이 없으면서도 virus 증식시 foreign protein을 계속 합성할 수 있는 recombinant chimeric viral vector를 개발하려는 연구로 (Fig.3c) University of California, San Francisco의 R. Andino와 New York Lederle-Praxis Biological의 N.M. Mattion이 이와같은 연구의 leading group이다. 다음은 이들 각 group의 연구를 좀더 상세히 설명하고자 한다.

1) Epitope substitution

Burke 등(6)은 poliovirus의 crystal 3차구조를 기초로 poliovirus capsid에서 major antigenic site를 추정 한 후 Sabin type 1 VP1의 immunogenic epitope 일부를 Sabin type 3 fragment로 치환한 후 Hep-2 세포에 transfection하여 poliovirus chimera를 만들고 실험동물에서 이 chimeric virus의 Sabin type 3에 대한 면역유도능을 확인 하였다. 또한 같은 group에서는 Sabin 1 cDNA의 VP1 위치에 새로운 제한 효소 Dra I site를 첨가한 cassette vector(pCAS1)를 만들고 여기에 HIV-1 III B strain의 env gene 중 gp41의 18개 아미노산을 도입한 chimeric virus를 생산하여 HIV-1에 대한 항원성과 면역유도능을 조사하였다. 그들의 실험결과에 따르면 polio/HIV-1 chimeric virus에 의해 생산된 항체가 gp41에 특이성을 나타내었다. 또 이 항체는 몇 종의 미국형 및

아프리카형 HIV-1에 중화력을 나타내고 HIV에 의한 syncytia 형성을 억제하였다(18). 같은 group에서 Jenkins 등(24)은 동일한 vector에 자궁암을 유발하는 human papilloma virus type 16의 major capsid protein인 L1 단백질 중 16개 amino acid sequence를 Sabin cDNA의 새로 도입한 제한효소 부위에 cloning하여 recombinant virus를 생산하고 이를 토끼에 면역하여 항 혈청을 분석한 결과 이 항체가 *E.coli*에서 생산된 L1-fusion protein과 반응하는 것을 확인하였다. 1992년 Dedieu 등(13)은 Sabin cDNA의 VP1 region에 Sal I - Sac I 제한효소 site를 도입하고 여기에 HIV-1의 principal neutralizing domain(PND) 부분을 길이를 달리하여 재조합한 후 유전적으로 안정한 2개의 chimeric polio/HIV-1 virus를 만들었다. 이 재조합 virus로 기존의 HIV-1 중화항체와의 반응 및 토끼에서 HIV-1의 항혈청 생성능을 조사한 결과 재조합 virus중 하나가 비록 약하기는 하지만 HIV-1에 특이한 면역유도능이 있다는 것이 보고되었다. 그외 Trachoma나 sexually transmitted disease를 일으키는 *Chlamydia trachomatis* 에 대한 vaccine 개발을 위해 Murdin 등(40)은 poliovirus Mahoney cDNA의 VP1 anigenic site에 제한효소 cartridge를 만들고 여기에 *C.trachomatis*의 major outer membrane protein (MOMP)의 neutralizing epitope를 cloning 하여 recombinant poliovirus를 만들고 이를 토끼에 주사하여 항 혈청을 얻었다. 이 항 혈청을 분석한 결과 순수분리한 MOMP나 synthetic

neutralizing peptide로 immunizing한 것보다 10-100배나 항체역가가 높은 것을 확인 하였으며 이 항체가 in vitro와 in vivo에서 매우 효과적으로 *C. trachomatis*의 활성을 중화시킨다는 사실도 보고 하였다. 또한 gp120와 결합하는 CD4 antigen도 이와 비슷한 방법으로 13-23 amino acid를 poliovirus Sabin 1 에 cloning 하여 recombinant virus를 얻은 다음 이를 항원으로 monoclonal antibody를 생산하였을 때 6개의 단clone항체 중 5개가 soluble CD4와도 반응하는 것을 보고하였다 (51).

2) Poliovirus minireplicon

Epitope substitution은 그 자체의 한계성 때문에 25 amino acid 이상의 foreign antigen을 삽입하면 assembly에 문제가 생겨 recombinant virus가 생산되지 않으므로 실재 여러 가지 vaccine 개발을 위한 vector로는 별로 적합지 않은 방법일 것이다. 이러한 한계점을 극복하기 위해 University of Alabama의 C.D. Morrow는 아예 poliovirus cDNA의 capsid 유전자 부위의 일부 또는 전부를 제거하고 여기에 full-length vaccine 유전자를 cloning한 다음 이를 in vitro에서 poliovirus capsid protein expression vector와 co-transfection하여 defective virus particle인 minireplicon을 얻은 다음 이를 animal에 주사하여 vaccine가능성을 연구하고있다. Choi 등(11)이 poliovirus VP2, VP3를 제거하고

여기에 HIV-1의 gag 및 pol 유전자를 대체시켜 만든 RNA를 transfection 시켰을 때 RNA가 세포 내에서 증식 및 발현되는 것이 확인되었으며 또한 같은 group에서 이 RNA를 poliovirus capsid를 발현하는 recombinant vaccinia virus와 co-transfection 시켰을 때 polio/HIV-gag 혹은 polio/HIV-pol minireplicon이 encapsidation되었으며 또 vaccinia virus 대신 wild type Sabin 1 poliovirus와 co-transfection해도 encapsidation 된다는 것이 확인되어 vaccine vector로서의 가능성을 제시하였다(46,47). 또한 이 group의 Porter 등(48)은 replicon에 감염된 세포가 55 kDa 의 Gag 단백을 생산할 뿐 아니라 전자 현미경 분석결과 이 단백질이 plasma membrane에 posttranslational modification된 형태로 발현되기 때문에 구조적으로도 wild type 단백질과 비슷하여 효과적으로 면역을 유도할 것이라고 주장하고 있다. 실재로 이들은 carcinoembryonic antigen(CEA)을 capsid site(P1)를 완전히 제거한 poliovirus vector에 cloning하고 이를 capsid protein을 발현하는 recombinant vaccinia virus (VV-P1)와 co-transfection 하여 encapsidated replicon 을 생산한 다음 이를 poliovirus-specific receptor를 발현하는 transgenic mice에 면역하여 CEA-specific antibody가 생산되는 것을 확인 하였다(2). 그러나 증식력이 없는 defective virus를 vaccine으로 사용할 경우 viral vaccine이라기 보다는 immunogen으로 작용 가능성이 높아 mucosal immunity를 충분히 유도할 수 있을지 의심스러우며 그렇다고 in vivo 상

에서 co-transfection에 의한 complementation 효과를 기대할 수도 없으므로 실제 이 system을 사용해 실용화 단계의 vaccine을 개발한다는 것은 많은 한계가 있을 것으로 보인다.

3) Autoprocessing poliovector containing newly added 3C-protease recognition site

최근 Andino 등(1)에 의해 제시된 poliovirus를 vector로 이용한 vaccine 개발의 새로운 system은 기존의 알려진 방법에서 여러가지 한계점을 보완한 매우 가능성 있는 model이라 하겠다. 이들은 poliovirus-specific 3C protease의 특성을 살려 3C에 대한 cis-acting site를 poliovirus cDNA의 vaccine cloning site에 새로이 도입하는 방법으로 vaccine vector 개발하였다. 대부분의 picornavirus는 subgenome이 Gln-Gly으로 연결되어있어 3C protease가 이 부위를 인식하고 잘라냄으로서 functional protein이 만들어지고 viral assembly도 일어난다 (Fig.4). 2A도 protease로 작용하지만 이는 거의 P1/P2 site의 cutting에 제한되고 long polyprotein processing의 대부분을 3C(or 3CD) protease가 담당한다 (15). Mutation 실험에 의하면 Gln-Gly가 다른 아미노산으로 바뀔때 virus증식이 억제되거나 현저히 감소되었다 (25). 이런 특성을 이용하여 foreign gene을 poliovirus VP4 앞에 cloning하고 foreign gene과 VP4 사이에 3C

protease-recognition site를 새로이 도입 함으로 이 recombinant poliovirus가 증식할 경우 foreign gene product도 함께 합성되나, 3C protease의 작용에 의해 제거되므로 chimeric viral RNA는 정상적인 capsid 단백질에 의해 encapsidation되고 foreign gene product는 virus 증식동안 계속 합성되어 항원으로 작용함으로 recombinant virus 감염부위인 점막 근처에서 점막 및 체액성 면역을 유도하게 된다는 것이다. 이들은 Mahoney cDNA clone의 initiation codon 바로 다음에 여러 종류의 vaccine 으로 개발할 foreign gene을 - Cholera toxin B (CTB)의 53개 amino acids, influenza virus A hemagglutinin 의 100 개 amino acids, HIV-1 nef protein의 207 amino acids, HIV-1 p17-p24 fusion protein 의 363 amino acids 등 - cloning 하고 foreign gene의 3'-end에 3C-protease recognition site를 도입하였다. 이 recombinant DNA를 Hela cell에 transfection하여 chimeric recombinant poliovirus를 만든다음 poliovirus receptor를 가진 transgenic mice(27,50)와 monkey에 감염시켜 mucosal immunity 유도능을 조사하였다. 이들의 실험에 따르면, 이 system의 경우 400여개의 아미노산까지 poliovirus vector에 cloning이 가능하며 증식속도도 wild type poliovirus에 비해 큰 차이가 없었다. 물론 foreign protein의 특성에 따라 virus 증식속도가 영향을 받기도 하지만 기본적으로 poliovirus genome의 15% 정도 되는 foreign gene은 비교적 안정하게 발현되며 재조합 poliovirus의 증식에도 크게 영향

을 주지 않는 것으로 나타났다(1). 또한 이 recombinant poliovirus를 poliovirus receptor를 발현하는 transgenic mice 복강에 주입하였을 때 foreign protein에 대한 항체생산이 확인되었으며 이를 원숭이 직장(rectum)에 주입한 결과 2주만에 mucosal immunity가 유도되는 것이 확인되었다. 이와 비슷한 시기에 Mattion 등(33)은 Sabin 3 cDNA를 vector로 VP4 앞과 VP1 뒤에 각각 3C protease recognition site와 multiple cloning site를 새로이 도입한 cDNA vector를 개발하고 여기에 rotavirus outer capsid protein인 VP7과 Hepatitis B virus surface antigen의 일부를 cloning하여 (14) Vero cell에서 recombinant chimeric virus를 얻고 *in vitro*에서 이들의 생화학적 특성을 조사하였다. 이들에 따르면 Sabin vector의 경우 약 300 base pair 정도까지 foreign gene이 비교적 stable하게 passage되나, 삽입된 유전자가 클 경우 불안정하여 passage 과정에서 유전자 결손이 일어난다고 한다. One-step growth curve 실험에서 chimeric virus의 증식속도가 야생형에 비해 느리며 최종 virus titer도 original Sabin 3에 비해 10배 정도 낮은 것으로 관찰되었다. 그러나 이들은 immuno-precipitation 실험으로 감염된 vero cell lysate에서 VP7이 발현되는 것을 관찰할 수 있었다. 이와같은 연구들은 직접 동물에 vaccination한 후 감염을 억제할 수 있는지까지는 진행되지는 않아 동일 항원에 대한 vaccine 으로 사용가능 여부는 더 연구되어야 하겠지만 현재까지의 실험결과들은 poliovirus 가 vaccine 개발

의 live vector로 매우 유용하게 사용될 수 있으리라는 추측을 더욱 확실하게 해 준다. 특히 최근 AIDS vaccine 개발에서 강조되고 있는 mucosal immunity 유도에도 poliovirus를 vector로 사용할 경우 매우 효과적인 결과를 기대할 수 있을 것으로 예상된다.

제 3장 연구수행 내용 및 결과

제 1절 : 연구수행 내용

1) Poliovirus cDNA를 가진 recombinant plasmid 합성
poliovirus Sabin type 1 cDNA를 동경대학의 A. Nomoto 박사로부터 제공받아 이를 T7 promotor와 f1 유전자를 가진 pTZ18/R plasmid의 EcoR1 site에 cloning 하여 Sabin type 1 cDNA-containing recombinant plasmid(pTZ-pVS1)를 합성하였다.

2) Multiple cloning site와 3C protease cleavage site 도입
Sabin cDNA의 5'-noncoding region 마지막(sequence number 740) 부위에 외부 유전자를 쉽게 도입할 수 있도록 본 실험에 필요한 모든 plasmid에서 unique 하게 나타나는 제한효소 site들(SstII-ApaI-EagI)과 3C-protease 절단부위를 subcloning, site-specific mutagenesis 방법으로 새로이 도입하고(Fig.1) 이 부분을 1)에서 합성한 recombinant plasmid의 일치되는 부위와 치환하여 최종적으로 full-length의 modify 된 recombinant plasmid(pTZ-PVS-3m)를 만들었다. 또한 VP3/VP1 junction 부위에 multiple cloning site(ApaI-HpaI-XhoI)와 3C-protease cutting site를 새로이 도입한 plasmid (pTZ-PVS-4m) 도 그림 2(Fig.2)의 과정을 거쳐 합성하였다.

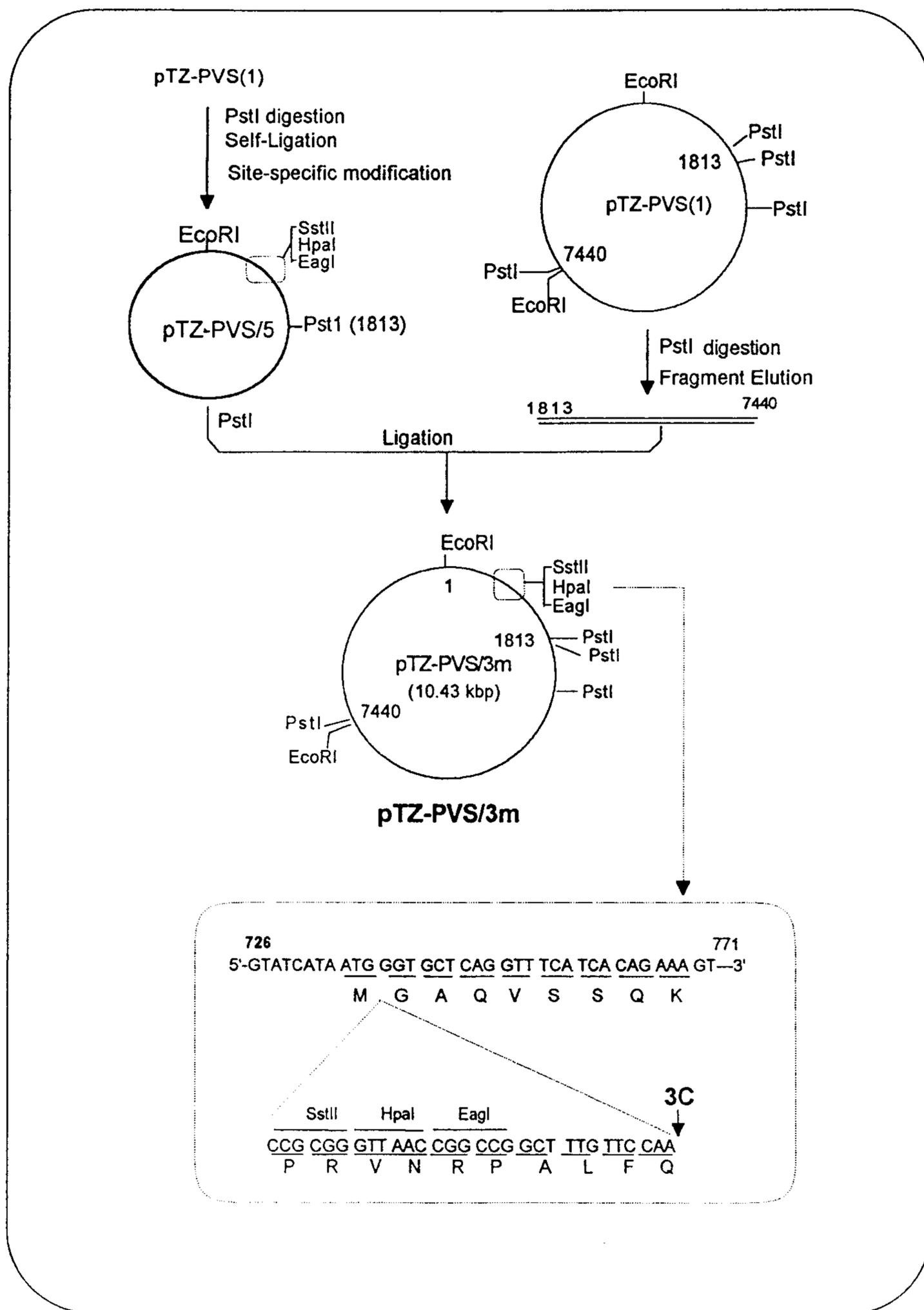


Fig 1. Schematic illustration for the construction of pTZ-PVS-3m vector by adding new multiple cloning site (SstII-HpaI-EagI) and 3C-protease recognition site at the N-terminal region of poliovirus Sabin cDNA.

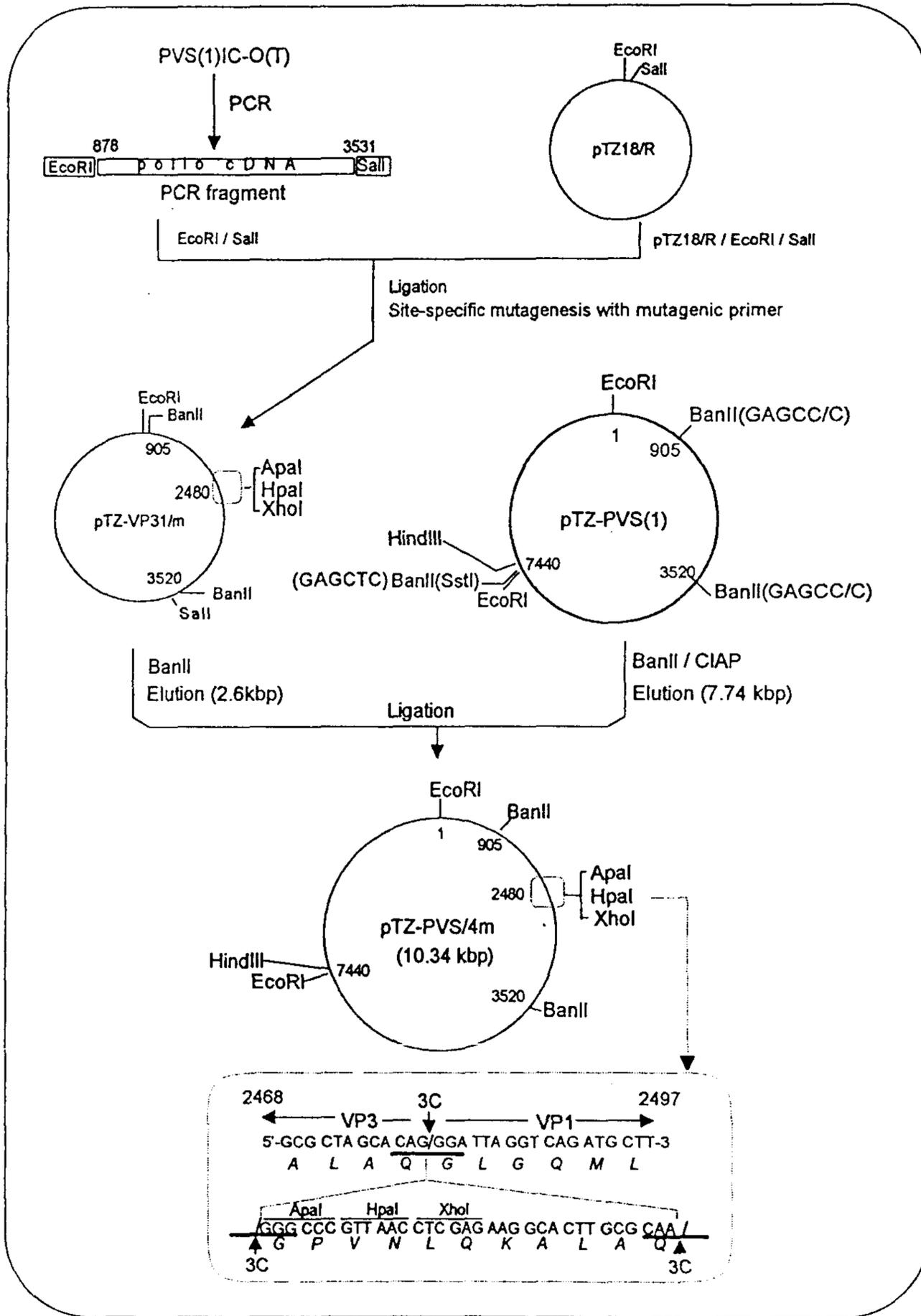


Fig 2. Schematic illustration for the construction of pTZ-PVS-4m vector by adding a multiple cloning site(Apal-Hpal-XhoI) and 3C-protease cutting site at VP3/VP1 junctional site of Poliovirus Sabin 1

3) Plasmid에서 recombinant poliovirus 생산

제한효소 인식부위와 3C-protease cleavage site가 도입된 Sabin cDNA-containing plasmid를 in vitro transcription하여 recombinant viral RNA를 얻고 이를 HeLa 세포에 transfection 시켜 progeny virus의 생산여부를 확인하였다.

4) Progeny virus의 생화학적 활성조사

Recombinant progeny virus의 증식능, 지속적인 계대배양시 유전자의 안정성, enteric virus의 특징인 pH stability, 항원성 유지여부 등, 생화학적 특성을 야생형과 비교조사 하였다.

5) p24를 발현하는 chimeric poliovirus 합성

그림3 (Fig.3)과 같이 HIV-1 p24 유전자중 N-terminal 169 amino acid 부위를 pTZ-PVS-3m 의 multiple cloning site에 cloning 하고 이를 in vitro transcription 후 HeLa cell에 transfection 하여 chimeric poliovirus를 합성하고 이 virus가 과연 HIV-1 p24를 발현하는지를 western blot 실험으로 확인 하였다.

6) Env library 합성 및 탐색

Env library 합성을 위해 V3를 중심으로 random sequence {5'-ATT AAT TGT ACA AGA CCC (AGC)(AG)(AC) A(AGC)C (ATC)(AC)T (AG)(ACT)A A(AG)A A(AGT)A (AG)G(AT) ATC (AC)AGC)T (AG)T(CG) GGA C(AC)A

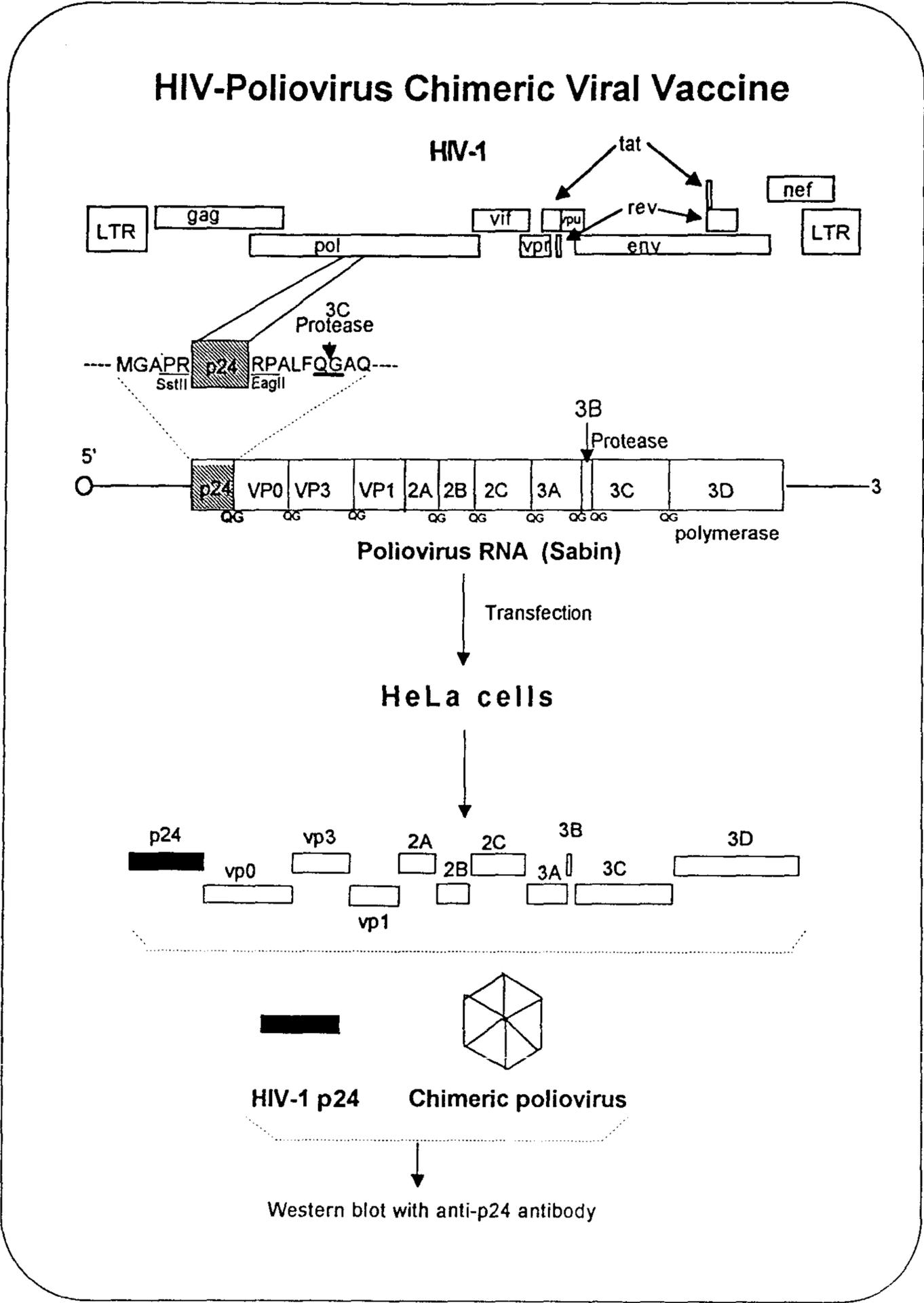


Fig 3. Experimental flowchart to construct a chimeric virus which express HIV-1 p24 when infected. DNA fragment of HIV-1 p24 was cloned into SstII/EagI site of pTZ-PVS-3m vector. Recombinant plasmid was transcribed into RNA and then introduced into HeLa cell, resulting in the production of chimeric poliovirus. The chimeric virus was tested for its capacity to express HIV-1 p24 when infected.

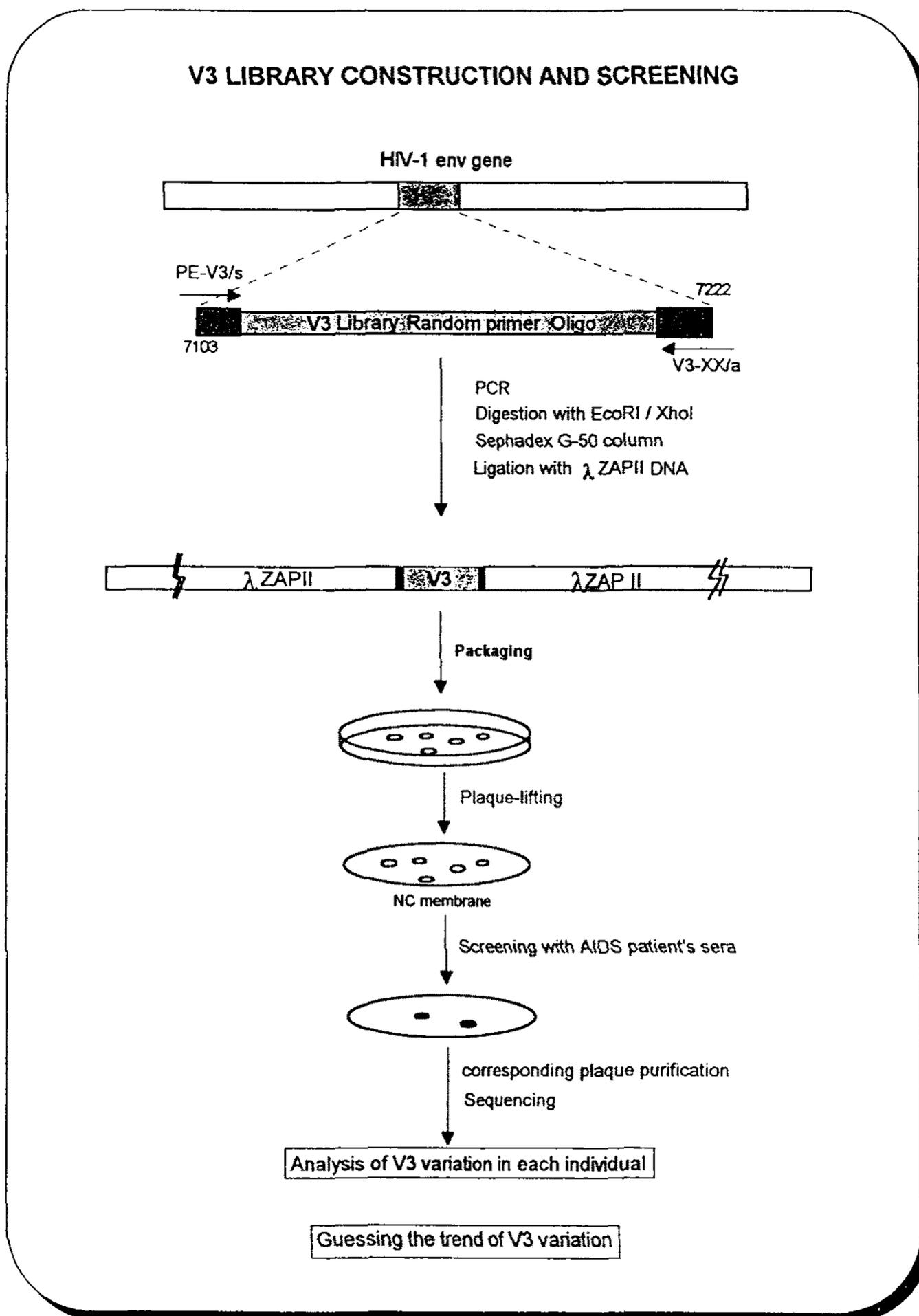


Fig 4. Schematic illustration of V3- λ library construction and screening with AIDS patient's sera. Synthetic random primer(119-mer) corresponding to the V3 sequence was targeted to PCR amplification and ligated into λ -corresponding restriction site to generate λ -V3 library. The Library was screened with Korean AIDS patients' sera. Positive clones were sequenced and statistically analyzed to identified the tendency of env gene variation according to the AIDS progression.

GGG (AC)(AG)A (AG)CA (ACT)TT (AGT)(AT)T
 (AG)CA A(CT)A (AG)(AG)A (ACG)N(AT) ATA
 (AG)(TC)A GGA (AG)A(ATC) ATN AGA (AC)AA GCA
 CAT TGT AAC ATT-3'} 를 합성하고 이를 target으로 양
 끝에 EcoRI site와 XhoI site가 생기도록 PCR primer를 만들
 어 (5'-GCTGCAGGAATTCAATTAATTGTACAAGAC-3'
 5'-TTCTAGACTCGAGACTAATGTTACAATGTGCTT-3)
 이 random sequence를 PCR로 증폭한 다음 λ ZAPII에
 cloning 하여 env expression library를 합성하고 이를
 rabbit-anti gp120-antibody와 우리나라 AIDS 환자에게서 얻
 은 혈청으로 screening 하여 positive clone 의 sequence를
 밝히고 이를 통계처리하여 AIDS 진행에 따른 V3 sequence
 variation을 비교분석하였다 (Fig.4).

7) BCG를 이용한 mucosal vaccine 개발 가능성 조사

동일기간 중 mucosal vaccine 생산을 위한 live vector로
 BCG의 사용 가능성을 알아보기 위해 그림 5의 과정을 거쳐
 HIV-1 p24를 BCG-E.coli shuttle vector인 pMV261 plasmid
 에 cloning 하고 이를 BCG에 도입하여 발현 여부를 확인한
 다음 guinea pig에 면역시켜 지연성 과민반응(DTH)과 항체
 생성정도를 측정하였다.

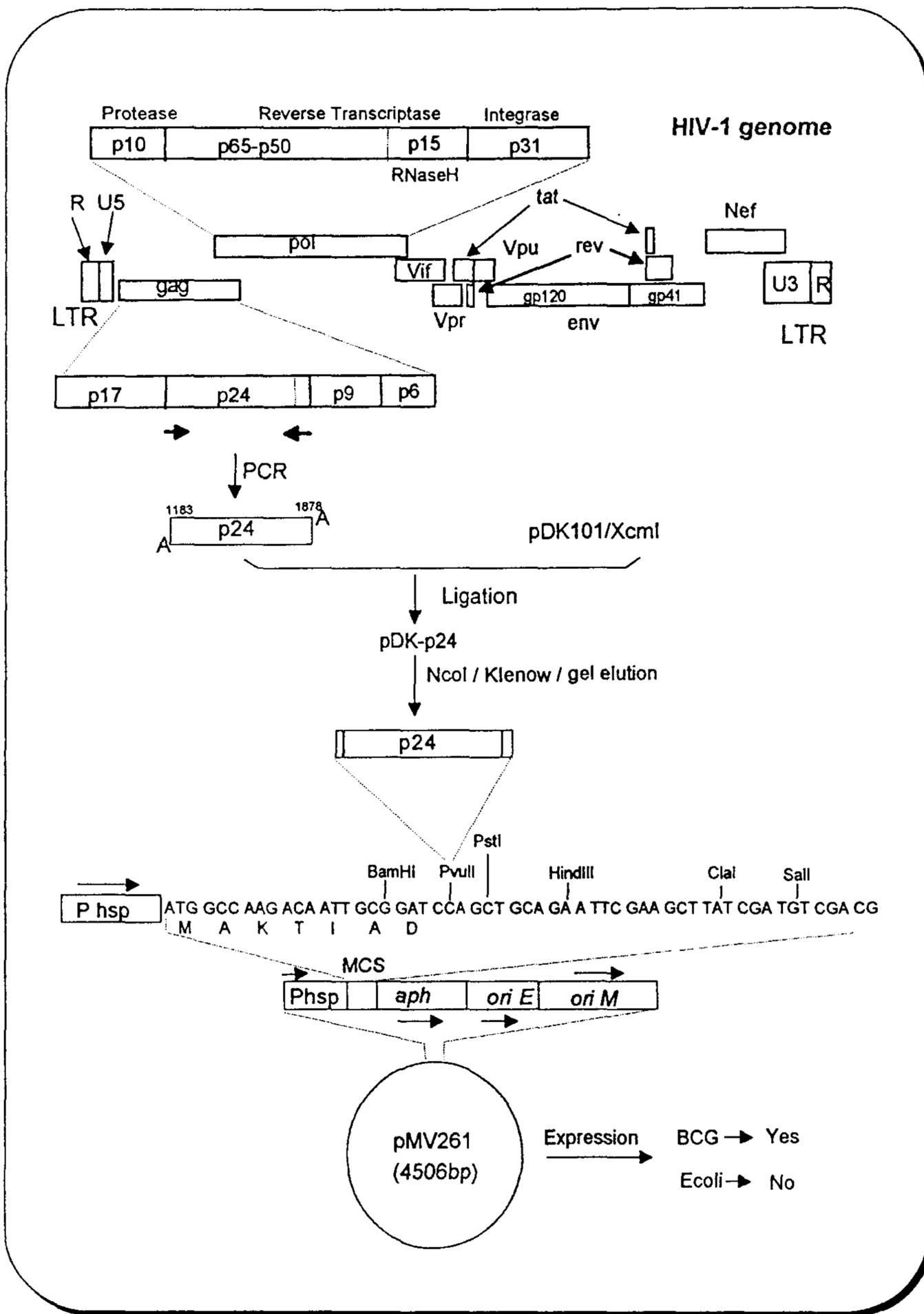


Fig 5. Experimental flow chart to construct recombinant BCG which produce HIV-1 p24. HIV-1 p24 gene was cloned into pMV261shuttle vector, and then introduced into BCG. p24 expression in BCG under the control of PMV heat-shock promoter was also examined.

제 2절 연구결과

1) Gene manipulation of Poliovirus Sabin cDNA

Poliovirus Sabin I cDNA 를 pTZ18R의 EcoRI site에 cloning(pTZ-PVS)하고 N-terminal 쪽에 새로운 유전자를 도입하기 용이 하도록 5'쪽 1813 bp를 subcloning (pTZ-PVS/5) 하였다. 그림 1에서와 같은 mutagenic primer를 사용하여 pTZ-PVS/5의 initiation site에 site-specific mutagenesis로 multiple cloning site(SstII-ApaI-EagI)와 3C-protease cutting site를 새로이 도입하여 pTZ-PVS/5-3m을 cloning 하였다(Fig.1). 3m primer 외에도 이전에 3개의 primer 사용하여 N-terminal 의 M-G-A/Q-V-S- 사이에 SstII-ApaI-EagI site와 3C-recognition site를 도입하고 3C-cutting 후 N-terminal에 myristoylation site를 넣어주기 위해 Gly 잔기 두 개를 붙인 pTZ-PVS/5-m, 동일 한 곳에 Gly 잔기를 한 개만 가진 pTZ-PVS/5-2m, 새로도입한 sequence의 G/C-content를 낮추어주기 위해 multiple cloning site를 SstII-HpaI-XhoI으로 바꾸어 놓은 pTZ-PVS/5-2m/1 재조합 plasmid를 합성하였다. 또한 보다 낫은 vector 개발을 위해 viral cDNA 의 VP3/VP1 연결부위에 ApaI-HpaI-XhoI site 와 3C-cutting site를 새로이 도입한 pTZ-PVS/vp31-4m plasmid (Fig.2)도 합성하였다. 이들 subclone 들을 Sabin cDNA의 correspondin site에 치환하여 full-length 의 재조합 cDNA plasmid를 합성하였다.

2) Recombinant poliovirus 합성

Full-length recombinant poliovirus cDNA(pTZ-PVS-m, 2m, 2m/1, 3m and 4m)를 합성하고 sequence를 확인한 후 (Fig.6)이를 SalI 으로 linearize 시킨 다음, *in vitro* transcription하여 얻은 RNA(Fig.7)를 HeLa cell에 transfection시켜 recombinant progeny virus를 생산 하였다(Fig.8). pTZ-PVS-m 과 -2m은 progeny virus를 합성하지 못하였으며, -2m/1은 transfection tl 아주 드물게 plaque를 만들기는 하였으나, 추출한 progeny virus는 감염성이 너무 낮아 앞으로 vaccine 개발의 vector로 사용 할 수 없으므로 더 이상 연구를 진행하지 않았다. 그림 8은 cDNA에서 합성한 RNA transcript를 HeLa cell에 transfection 시켰을 때 wild type Sabin 과 PVS-3m 및 PVS-4m 재조합 virus에 의해 만들어진 plaque 이다.

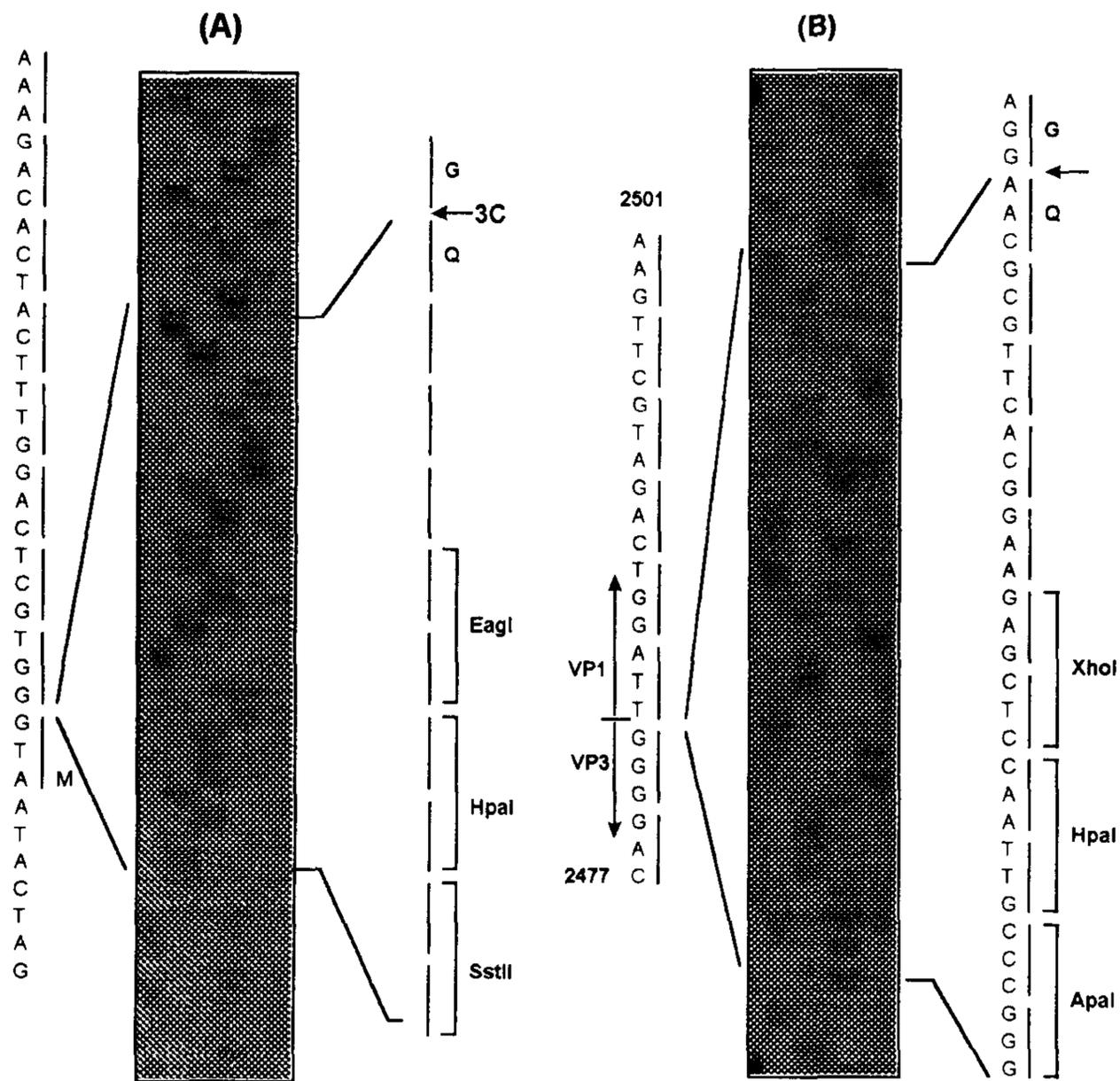


Fig. 6 Newly introduced multiple cloning site and 3C-protease cutting site were confirmed by sequencing. Each panel shows the sequence of pTZ-PVS/3m (A) and /4m(B) around the mutagenic area. Multiple cloning site(MCS) and 3C-protease cutting site were newly introduced at the N-terminal region(745/746) of wild type Sabin and VP3/VP1 junctional site (2482/2483). Newly introduced restriction enzyme sites and 3C-protease cutting sites are indicated by (|) and horizontal arrows.

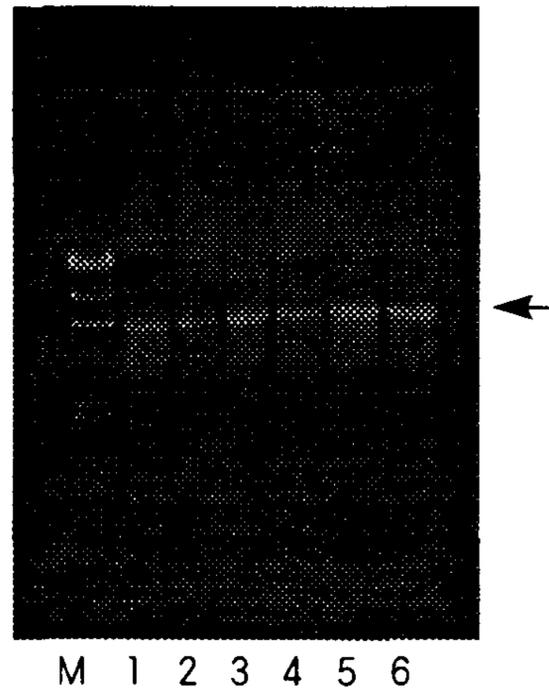


Fig 7. Synthesis of RNA transcript from wild type and recombinant cDNA of poliovirus Sabin 1. Linearized cDNAs of about 0.1 ug were transcribed by T7 RNA polymerase in the presence of RNase inhibitor. Each lane shows RNA transcribed from linearized cDNA of pTZ-PVS/wt(1), pTZ-PVS-m(2), pTZ-PVS-2m(3), pTZ-PVS-2m/1(4), pTZ-PVS-3m(5), and pTZ-PVS-4m(6).

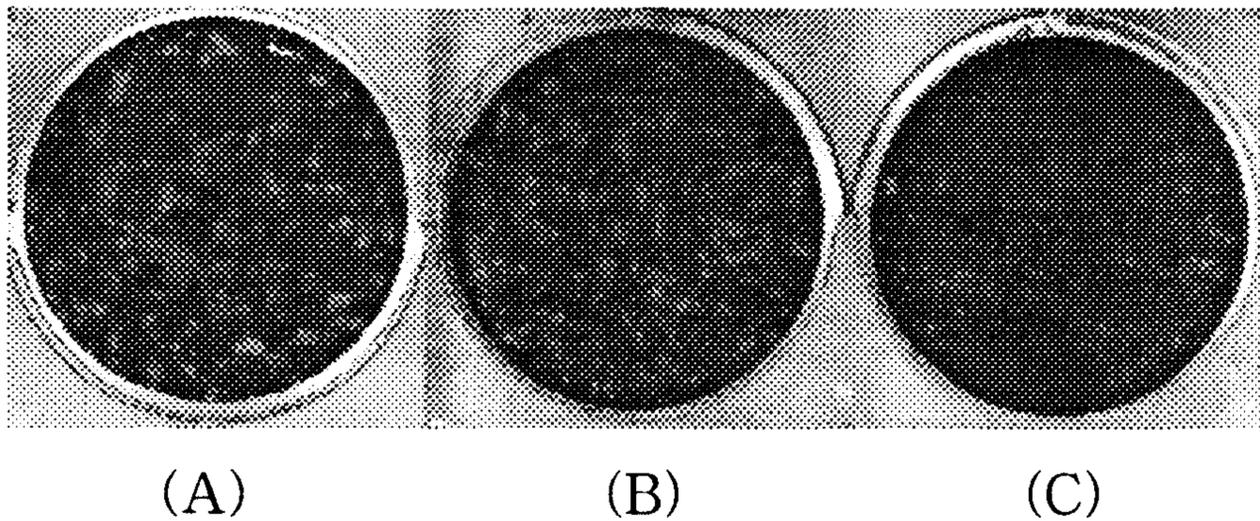


Fig 8. Plaque formation by transfection of RNA transcript. HeLa cell monolayers about 60% were transfected with 1ug of RNA transcripts synthesized from cDNAs of pTZ-PVS/wt(A), pTZ-PVS-3m(B), and pTZ-PVS-4m(C) in the presence of 500ug/ml of DEAE-dextran. Transfected cells were covered with 1% low melting agarose-DMEM supplemented with 5% FCS. Two days after transfection, cells were stained with 1% crystal violet.

4) Biochemical and immunological analysis of recombinant poliovirus

Recombinant virus의 transfection efficiency를 조사한 바 표 1과 (Table 1) 같이 Sabin 의 경우 pathogenic 한 Mahoney 주에 비해 ug 당 20 배 이상 transfection efficiency가 낮았다. 그러나 이 야생형 Sabin은 충분한 vaccine 효과를 나타내므로 vector로 개발하는 재조합 virus 인 PVS-3m과 PVS-4m도 이정도 efficiency 이면 충분하리 라고 예상된다. 그러나 PVS-m 과 PVS-2m은 transfection 시 전혀 progeny virus를 합성하지 못하였으며, PVS-2m/1은 transfection efficiency가 너무 낮아 vaccine 개발의 vector로 는 부적합 하다고 판단되어 진행되는 연구에서 제외 시켰다. 이 재조합 virus 의 replication capacity를 알아보기 위해 one-step growth 실험을 실시한 결과 그림9(Fig. 9)에서 보 듯이 PVS-3m은 야생형 Sabin 1 과 비슷한 capacity를 가지 나 PVS-4m은 야생형에 비해 5-10배정도 낮은 것으로 나타 났다. 새로 도입한 유전자의 stability를 조사하기 위해 3m , 4m 재조합 virus를 10회 이상 계대배양한 후 새로 도입한 유 전자 부위의 sequence를 조사하였으나 sequence 상에 전혀 변화가 없는 것으로 나타났다. 또한 Sabin I strain을 대량 culture하여 농축시킨 다음 이를 immunogen으로 mouse에 4회에 걸쳐 면역시켜 항혈청을 얻었으며, 이 항혈청으로 야생 형과 재조합 virus를 조사 하였으나 immuno precipitation and western blot 실험에서 차이를 발견 할 수 없었다.

Table 1. Transfection efficiency of RNA transcripts

RNA Transcript	Number of Plaque*
Mahoney	
pT7PV1/5	1×10^4
Sabin	
pTZ-PVS/wt	2×10^3
pTZ-PVS-m	0
pTZ-PVS-2m	0
pTZ-PVS-2m/1	<1
pTZ-PVS-3m	1.9×10^3
pTZ-PVS-4m	2×10^2

* 1 μ g of RNA transcript were introduced into monolayered HeLa cells

Replication Capacity of r-Poliovirus

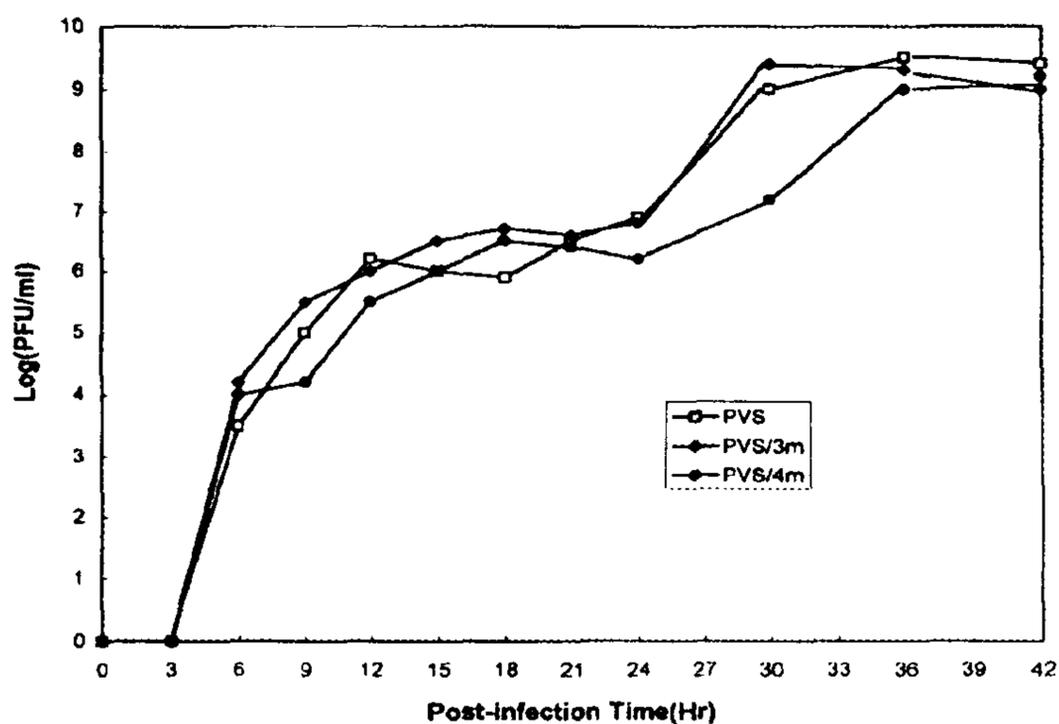


Fig. 9 One-step growth experiments with wild type and recombinant Sabin progeny viruses. Subconfluent HeLa cells were infected with wild type and recombinant Sabin poliovirus by 0.1 moi. Supernatants were harvested every 3 hrs and then titrated for the amounts of progeny viruses by TCID₅₀.

5) HIV-1 p24를 발현하는 chimeric poliovirus 합성

pTZ-PVS-3m vector를 사용하여 multiple cloning site의 SstII/EagI site에 HIV-1 p24의 N-terminal 169개 amino acid를 coding 하는 유전자를 cloning 하고 이를 Hela cell에 transfection 시켜 chimeric progeny virus를 생산하는 데 성공하였다. 이 chimeric virus를 HeLa cell에 감염 증식 시키고 일정시간 후 감염된 세포와 배양배지에서 HIV-1 p24를 조사한 결과 그림 10(Fig 10)와 같이 매우 효과적으로 p24가 발현됨을 확인 하였다.

6) 우리나라 AIDS 환자의 V3 variation 조사

Random sequence로 env library를 만들었으며 증폭전 5×10^6 pfu의 phage를 얻었다. 이를 본 연구실에서 생산한 rabbit-anti-gp120 polyclonal antibody로 일차 screening 하였으며 7명의 우리나라 HIV-1 감염자 혈청으로 screening 하여 Fig.11 에서와 같은 positive clone을 가토 항체로 12개의 clone을 환자 혈청으로 78개의 clone을 얻어 V3주위의 sequence 를 조사하였으며(Fig 12) 이를 AIDS 진행과 관련지어 통계처리 한 결과 그림 13(Fig.13)에서 나타나듯이 CD4 숫자가 감소함에 따라 V3 전체에 연기성아미노산(basic amino acids)의 차지하는 비율이 늘어난다는 사실을 확인하였으며 기존의 보고와는 달리 position 11 24,25, 32 잔기에는 특별한 trand가 보이지 않았으나 13, 18잔기에서 유의수준에 드는아미노산의 변화를 관찰 할 수있었다. 그러나 현재의 표본 수로는 아직까지 AIDS 진행과 V3

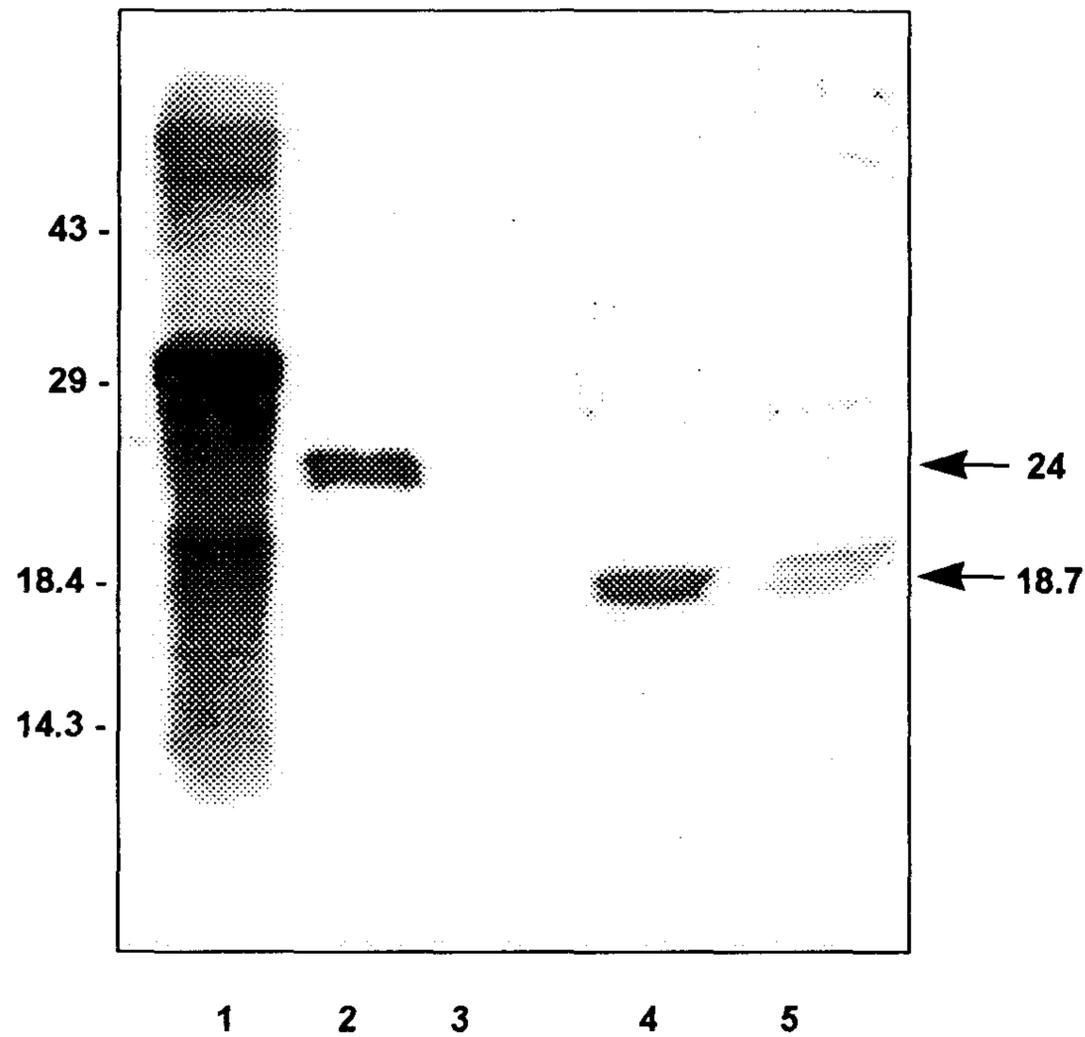


Fig.10. Western blot analysis of the p24 expressed in the chimeric poliovirus-infected cells. Culture supernatant and cell extracts from HeLa cells infected with chimeric poliovirus carrying N-terminal 169 amino acids of HIV-1 p24, were separated in 10% SDS-PAGE and analyzed by western blots with rabbit polyclonal antibodies against HIV-1 p24. Each lane shows r-p24-expressing bacterial lysates(1), HIV-1/-tat(2), control poliovirus-infected HeLa cell extracts(3), chimeric poliovirus-infected HeLa cell extracts(4) and culture supernatants of chimeric poliovirus-infected HeLa cells(5). Arrows indicate the bands of wild type and truncated p24 of 169-amino acids which is expressed from the chimeric poliovirus.

variation과의 뚜렷한 연관을 짓기가 어렵다고 판단된다. 그러나 현재의 자료로도 principal neutralizing domain의 GPGRAF 부위는 아미노산 뿐 아니라 핵산 염기서열도 큰 변화가 없는 것이 확인 되었다. 앞으로 이 library를 AIDS patient sera로 screening 할 경우 HIV-1 감염 초기부터 AIDS 진전과정에 따른 env gene 변화 양상을 알아보고 그 예후를 추측하는데 좋은 자료가 될뿐 아니라 multivalent vaccine 개발에도 근거자료가 될 수 있을 것으로 기대된다.

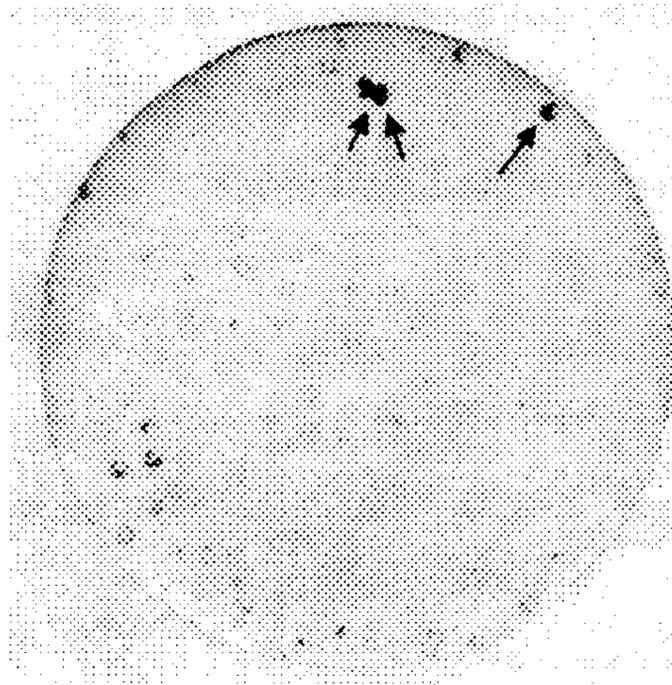


Fig.11 V3 library in the λ ZAP II were screened by plaque-lifting immunoblot experiment. Plaques of $0.5-2 \times 10^6$ /plate were transferred to the IPTG-soaked nitrocellulose membrane, and then screened with rabbit α -gp120 polyclonal antibody and AP-conjugated goat α -rabbit IgG. Positive plaques corresponding to the membrane signal, indicated by arrow, were purified and sequenced at cloned sites

seq. clone #	CTRPNNNTRKRI R I QRGPGRAEV T I G K I * GNMRQAHC	screened sera
A-9/1	- - - - G S H I K - - - - * * Q Q Q L Y A - E Q - V - D I - - - - -	
A-9/2	- - - - G S H I K - S - - M * * Q Q Q L Y A - E Q - V - D I - - - - -	
A-9/3	- - - - H S T A - R S - - V * * Q Q Q L D A T K R - A - S I - - - - -	
A-9/4	- - - - G S Y I K I - - S V * * Q Q Q T L - A - R H - A - D I - - - - -	
A-9/5	- - - - Q T P I - R G - P V * * Q Q Q T F - - E P - A - D I - - - - -	
A-9/6	- - - - E S P E - R G - S V * * Q Q Q T L Y A - - L - V - - I - - - - -	
A-9/9	- - - - R S P V K - G - P - * * Q Q Q T L - A - - P - A - D - - - - -	
A-2/1	- - - - D * S A - R G - H V * * Q Q Q T D A - - A - V - D I - - - - -	
A-2/2	- - - - D K P - - R G - S V * * Q Q Q L Y A - R R - V - D I - - - - -	
A-2/3	- - - - H S Y A - I G - H V * * Q Q Q E N - T R L - V - D I - - - - -	
A-2/4	- - - - R - S E - R G - - M * * Q Q Q I A T E P - A - E I - K - - - - -	
A-2/5	- - - - G S S E K - G - H V * * Q Q Q L F A T E A - I - G I - - - - -	
A-2/6	- - - - G T S V - R G - * V * * Q Q Q L D A - E T -	
A-2/7	- - - - R - S - K I G - - V * * Q Q Q T I I - T R T N	
A-2/8	- - - - H S - I - I G - S V * * Q Q Q L - A T - P - V - D I - - - - -	
A-2/9	- - - - - T Y V - - G - - M * * Q Q Q K I I - - - G - V - D - - - - -	
A-2/10	- - - - H S P V K I G - S M * * Q Q Q L I A - E A - V - D - - - - -	
A-2/11	- - - - R T S V - R G - - V * * Q Q Q F A T - R - V - G I - - - - -	
A-2/12	- - - - R S Y - - R G - - V * * Q Q Q - - T - R - V - D I - - - - -	
A-7/1	- - - - H - P A - I G - S V * * Q Q Q L - A - R G - A - - I - K - - - - -	
A-7/2	- - - - R - H I - - S - H - * * Q Q Q K F - - R G - A - - I - - - - -	
A-7/3	- - - - G T Y A - I G - - V * * Q Q Q F - - - G - V - - I - - - - -	
A-7/4	- - - - G S V A - I G - P V * * Q Q Q K F - - - V - A - - I - - - - -	
A-7/5	- - - - G T S A - R G - P M * * Q Q Q T L F - - - A - A - - I - - - - -	
A-7/6	- - - - H - T I - R - - P V * * Q Q Q K Y A - E V - I - D I - - - - -	

Fig. 12. Amino acid sequence of the clones which show positive signals in the immunoblot screening of V3- λ library. Consensus sequence is that of HXBc2 laboratory strain of HIV-1. Dotted line(-) indicates the amino acid as shown in the consensus sequence at the corresponding site. No amino acid matching site is denoted by asterisk(*).

No. of CD ₄ (mm ³)	V ₃ SEQ.											
	C ₁	T ₂	R ₃	P ₄	N ₅	N ₆	N ₇	T ₈	R ₉	K ₁₀		I ₁₂
200 < CD ₄ < 500	C ₂₂ (100%)	T ₂₂ (100%)	R ₂₂ (100%)	P ₂₂ (100%)	N ₁ (4.5%) R ₇ (31.8%) G ₅ (22.7%) D ₃ (13.6%) S ₂ (9.0%) E ₁ (4.5%) K ₁ (4.5%) H ₁ (4.5%) Q ₁ (4.5%)	N ₂ (9.0%) S ₁₁ (50%) T ₉ (40.9%)	P ₈ (36.3%) S ₅ (22.7%) H ₄ (18.1%) Y ₃ (13.2%) T ₂ (9.0%)	I ₉ (40.9%) A ₇ (31.8%) V ₄ (18.1%) E ₁ (4.5%) L ₁ (4.5%)	R ₁₂ (54.5%) K ₁₀ (45.4%)	K ₅ (22.7%) R ₁₀ (45.5%) I ₇ (31.8%)	 (72.7%) S ₃ (13.6%) R ₂ (9.0%) P ₁ (4.5%)	I ₂₂ (100%)
		I ₁₄	G ₁₅	P ₁₆	G ₁₇		A ₁₉	F ₂₀	V ₂₁	T ₂₂	I ₂₃	
	R ₅ (22.7%) S ₆ (27.2%) P ₅ (22.7%) T ₄ (18.1%) H ₂ (9.0%)	I ₄ (18.1%) V ₁₁ (50%) M ₇ (31.8%)	G ₂₂ (100%) ₁	P ₁₄ (63.6%) Q ₈ (36.3%)	G ₂₂ (100%)	R ₁₃ (59.0%) Q ₅ (22.7%) K ₄ (18.1%)	A ₁₄ (63.6%) T ₈ (36.3%)	F ₁₃ (59.0%) L ₇ (31.8%) I ₂ (9.0%)	V ₈ (36.3%) F ₅ (22.7%) Y ₄ (18.1%) N ₂ (9.0%) D ₂ (9.0%) I ₁ (4.5%)	T ₅ (22.7%) A ₁₇ (77.2%)	I ₁₄ (63.6%) T ₈ (36.3%)	G ₈ (36.3%) R ₆ (27.2%) K ₄ (18.1%) E ₃ (13.6%) D ₁ (4.5%)
		I ₂₆	* ₂₇	G ₂₈	N ₂₉	M ₃₀	R ₃₁	Q ₃₂	A ₃₃	H ₃₄	C ₃₅	
	T ₁ (4.5%) P ₅ (22.7%) L ₃ (13.6%) R ₃ (13.6%) A ₂ (9.0%) G ₁ (4.5%) D ₁ (4.5%) I ₁ (4.5%) S ₁ (4.5%) Q ₃ (13.2%) H ₁ (4.5%)	I ₂₂ (100%)	A ₁₀ (45.4%) V ₁₀ (45.4%) I ₂ (9.0%)	G ₂₂ (100%)	N ₄ (18.1%) D ₁₆ (72.7%) S ₁ (4.5%) K ₁ (4.5%)	M ₅ (22.7%) D ₁₇ (77.2%)	R ₂₁ (95.4%) G ₁ (4.5%)	Q ₁₉ (86.3%) K ₃ (13.6%)	A ₂₂ (100%)	H ₂₂ (100%)	C ₂₂ (100%)	
	Basic aa. 20.6%		Acidic aa. 5.97% _m			Neutral aa. 73.43%						

Fig. 13-2 Statistical analysis of the V₃ sequences of the positive clones selected from V₃-λ library screening with AIDS patients' (200 < CD₄ < 500) sera.

V ₃ SEQ. No. of CD ₄ (mm ³)	C ₁	T ₂	R ₃	P ₄	N ₅	N ₆	N ₇	T ₈	R ₉	K ₁₀	R₁₁	I ₁₂
	CD ₄ < 200	C ₁₈ (100%)	T ₁₈ (100%)	R ₁₈ (100%)	P ₁₈ (100%)	R ₇ (38.8%) G ₅ (27.7%) H ₂ (11.1%) S ₂ (11.1%) D ₁ (5.5%) E ₁ (5.5%)	N ₅ (27.7%) T ₈ (44.4%) S ₄ (22.2%) * ₁ (5.5%)	N ₁ (5.5%) S ₃ (16.6%) T ₄ (22.2%) P ₅ (22.2%) Y ₃ (16.6%) H ₂ (11.1%)	T ₁ (11.1%) A ₅ (27.7%) I ₆ (33.3%) V ₅ (27.7%) E ₁ (5.5%)	R ₁₇ (94.4%) K ₁ (5.5%)	K ₃ (16.6%) R ₉ (50.0%) I ₆ (33.3%)	R₁₁ R ₃ (16.6%) G ₁₃ (72.2%) S ₂ (11.1%)
R₁₁		I ₁₄	G ₁₅	P ₁₆	G ₁₇	R₁₈	A ₁₉	F ₂₀	V ₂₁	T ₂₂	I ₂₃	G₂₄
R ₅ (27.7%) P ₅ (27.7%) H ₄ (22.2%) N ₂ (11.1%) S ₁ (5.5%) L ₁ (5.5%)		V ₁₃ (72.2%) M ₂ (11.1%) I ₂ (11.1%) * ₁ (5.5%)	G ₁₇ (94.4%) E ₁ (5.5%)	P ₁₄ (77.7%) Q ₄ (22.2%)	G ₁₈ (100%)	R ₁₅ (83.3%) K ₂ (11.1%) Q ₁ (5.5%)	A ₁₁ (61.1%) T ₇ (38.8%)	F ₇ (38.8%) L ₇ (38.8%) I ₄ (22.2%)	V ₅ (27.7%) F ₅ (27.7%) Y ₄ (22.2%) D ₂ (11.1%) I ₁ (5.5%) N ₁ (5.5%)	T ₇ (38.8%) A ₁₁ (61.1%)	I ₁₁ (61.1%) T ₆ (33.3%) A ₁ (5.5%)	G ₁₀ (55.5%) R ₅ (27.7%) E ₃ (16.6%)
R₂₅		I ₂₆	* ₂₇	G ₂₈	N ₂₉	M ₃₀	R ₃₁	Q ₃₂	A ₃₃	H ₃₄	C ₃₅	
R ₄ (22.2%) L ₃ (16.6%) D ₂ (11.1%) T ₂ (11.1%) G ₂ (11.1%) V ₂ (11.1%) P ₂ (11.1%) I ₁ (5.5%)		I ₁₈ (100%)	A ₁₂ (66.6%) T ₃ (16.6%) V ₂ (11.1%) I ₁ (5.5%)	G ₁₇ (94.4%) E ₁ (5.5%)	N ₅ (27.7%) D ₈ (44.4%) E ₃ (16.6%) G ₁ (5.5%) I ₁ (5.5%)	I ₁₅ (83.3%) M ₃ (16.6%)	R ₁₈ (100%)	Q ₁₈ (100%)	A ₁₈ (100%)	H ₁₈ (100%)	C ₁₈ (100%)	
Basic aa. 21.1% Acidic aa. 3.65% Neutral aa. 75.25%												

Fig.13-3. Statistical analysis of the V₃ sequences of the positive clones selected from V₃-λ library screening with AIDS patients' (CD₄<200) sera..

8) Recombinant BCG의 vaccine 가능성 조사.

그림5.에서와 같이 Heat-shock promoter에 의해 발현이 조절되는 pMV261 vector에 HIV-1 core protein인 p24 유전자를 cloning 하고 이를 BCG에 옮겨 heat-shock으로 발현을 유도한 다음 AIDS patient serum과(Fig.14) anti-p24 monoclonal antibody(Fig.15)로 western blot 실험에서 p24가 BCG에서 발현됨을 확인하였다. heat-induction으로 p24가 BCG에서 3주이상 발현이 지속됨을 확인한 다음(Fig.16) recombinant BCG를 Guinea pig에 면역시켰을 때 5주 후 Skin test를 통해 p24에 대한 세포성면역이 효과적으로 유도됨을 확인 하였으며(Table 2), 혈청 분석결과 p24에 대한 체액성 면역도 잘 생성됨을 확인 할 수 있었다(Fig.17, 18) .

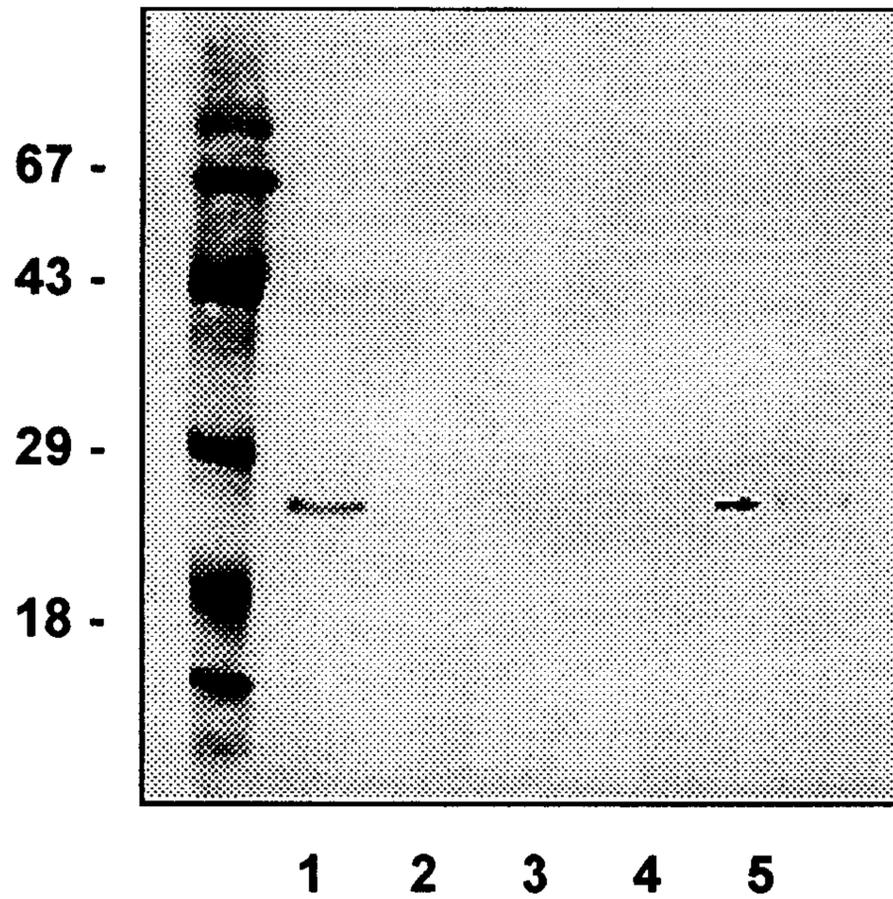


Fig.14 Western blot analysis of recombinant p24 with AIDS patient's sera. HIV-1 and recombinant bacterial lysates were western-transferred to a nitrocellulose membrane, and stained with AIDS patients' sera and anti-mouse-IgG-AP. Each lane shows HIV-1/-tat (1), BCG/no heat-induction (2), pMV261-p24/BCG/heat-induction (3), BCG/heat-induction (4), and pMV261-p24/BCG/heat-induction (5).

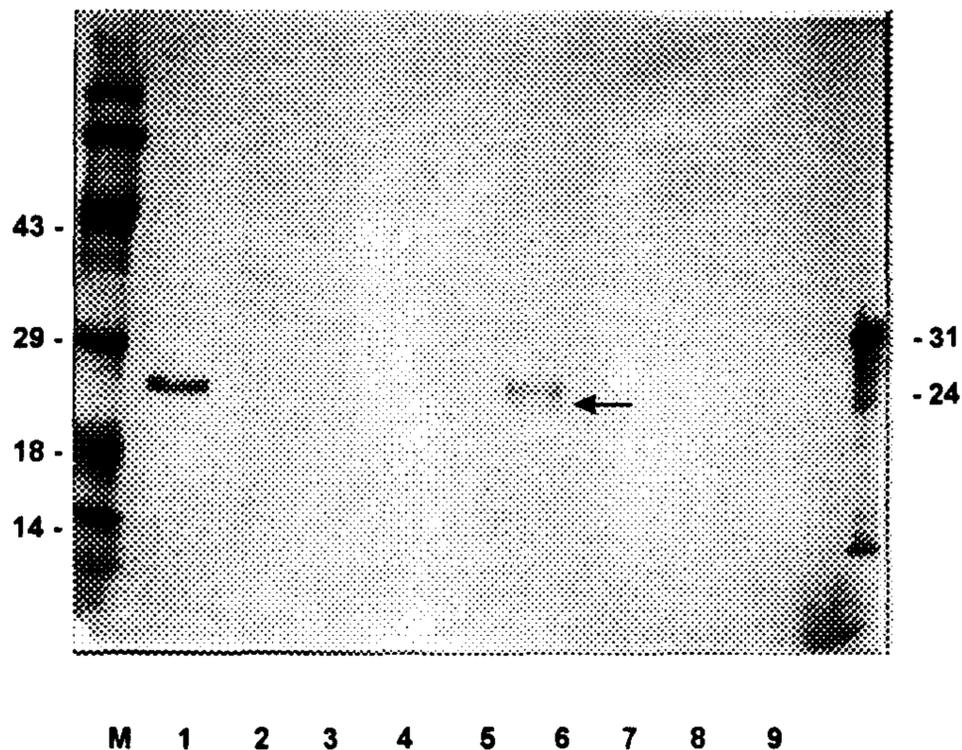


Fig.15 Western blot analysis of recombinant p24 with anti-p24 monoclonal antibody. HIV-1 and recombinant bacterial lysates were western-transferred to a nitrocellulose membrane, and stained with mouse anti-p24 monoclonal antibody (intracel, Cambridge, MA USA) and anti-mouse-IgG-AP. Each lane shows HIV-1(+tat) (1), BCG/no heat-induction (2), pMV261-p24/BCG/heat-induction (3), BCG/heat-induction (4), pMV261-p24/BCG/heat-induction (5), BL21(DE3) (6), pRSET-C (7), pRSET-p24/BL21(DE3)/no IPTG-induction (8), pRSET-p24/BL21(DE3)/IPTG-induced (9). Arrow indicates the p24 protein band which is expressed in recombinant BCG under the control of heat-shock promoter.

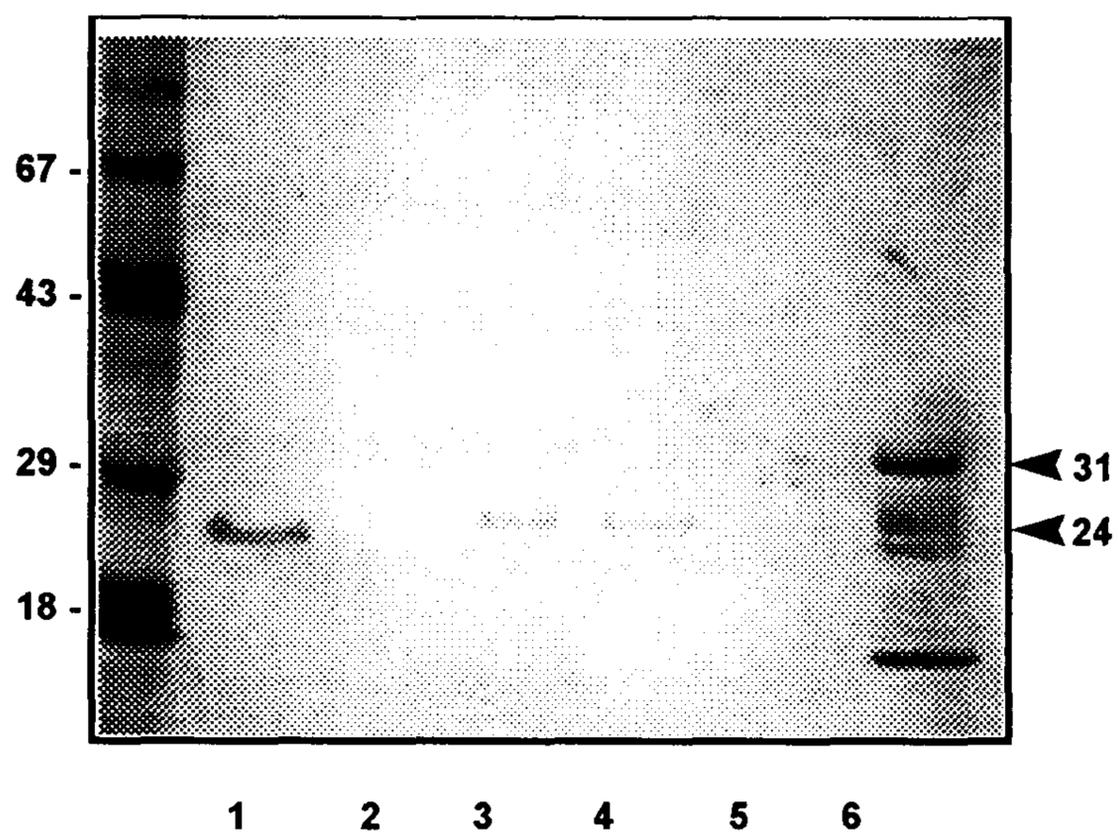


Fig. 16 Recombinant p24 stably expressed in BCG after heat-shock.
 Recombinant BCG(BCG-p24) broth culture, 5 days after seeding was incubated at 45°C for 2hrs to induce heat-shock promoter, and then further cultured at 37°C shaking incubator for 3 weeks. The sample was analysed by Western blot experiment to see whether p24 expression was stably maintained after heat-shock. Arrow indicates the p24 protein band of the recombinant BCG samples harvested a week after heat-shock. (1) HIV-1(Δ tat), (2) BCG, (3) BCG-p24(2weeks after heat-shock), (4) BCG-p24 (3 week after heat-shock), (5) BL21(DE3)/pRSETC, (6) BL21(DE3)/pRSETC-p24

Table 2. Guinea Pig DTH(48 hrs) against p24 and PPD

Response Infection	Animal No.	Skin test [†]						
		p24			PPD			
		0.4 μ g	2 μ g	4 μ g	0.1 μ g	0.2 μ g	0.4 μ g	0.8 μ g
Mock inf.	1 (♀)	0	0	3.0	0	0	0	0
BCG (Live)	2 (♀)	0	2.0	3.0	9.8	9.3	12.0	12.5
	3 (♀)	0	3.3	2.0	6.5	6.3	9.5	12.3
	mean	0	2.7 \pm 0.9	2.5 \pm 0.7	8.2 \pm 2.3	7.8 \pm 2.1	10.8 \pm 1.8	12.4 \pm 0.1
BCG-p24 (Killed)	4 (♀)	1.5	4.3	7.3	0	0	0	0
	5 (♀)	2.3	5.5	6.0	0	0	0	0
	6 (♀)	1.5	2.5	2.0	2.3	2.5	2.3	5.0
	mean	1.8 \pm 0.5	4.1 \pm 1.5	5.1 \pm 2.8				
BCG-p24 (Live)	7 (♀)	4.8	3.5	5.3	7.8	10.3	10.8	11.8
	8 (♀)	5.3	6.8	7.5	12.5	13.8	14.5	18.0
	9 (♀)	2.8	8.5	8.0	5.0	8.5	12.3	13.8
	mean	4.3 \pm 1.3	6.3 \pm 2.5	6.9 \pm 1.4	8.4 \pm 3.8	10.9 \pm 2.7	12.5 \pm 1.9	14.5 \pm 3.2

[†] Guinea Pigs were immunized with 1×10^8 cells of BCG or r-BCG intraperitoneally. Six weeks p.i., each of them was tested for the Delayed Type Hypersensitivities(DTH) to p24 and PPD with adjusting the amounts of dose. Induration size was measured 48 hrs after skin injection.

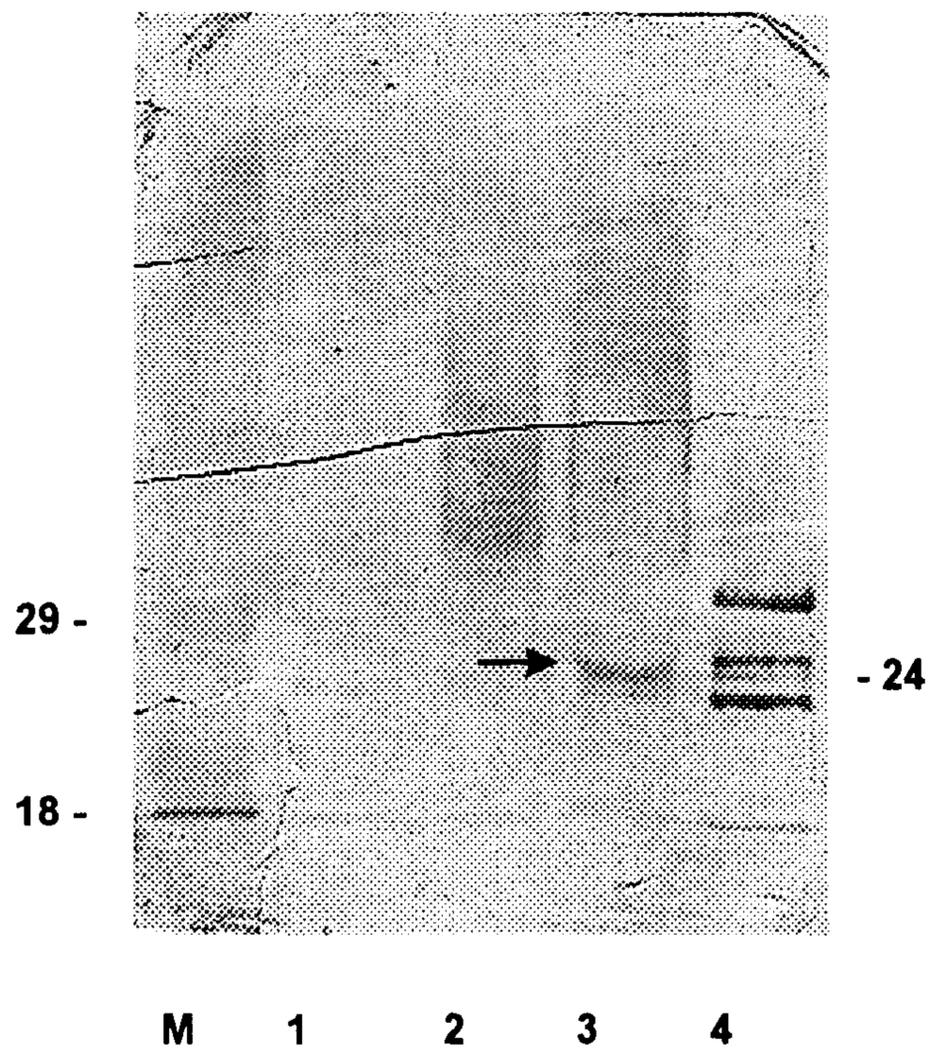


Fig. 17 Recombinant BCG induces an effective humoral immunity in immunized quinea pig. Serum prepared from a quinea pig 6 weeks after injection with 10^8 cells of recombinant BCG intraperitoneally was used in Western blot experiment. Arrow indicates the p24 protein band of r-BCG fraction detected by quinea pig serum in Western blot experiment. (1) HIV-1(Δ tat), (2) BCG, (3) BCG/p24, (4) BL21(DE3)/pRSETC-p24

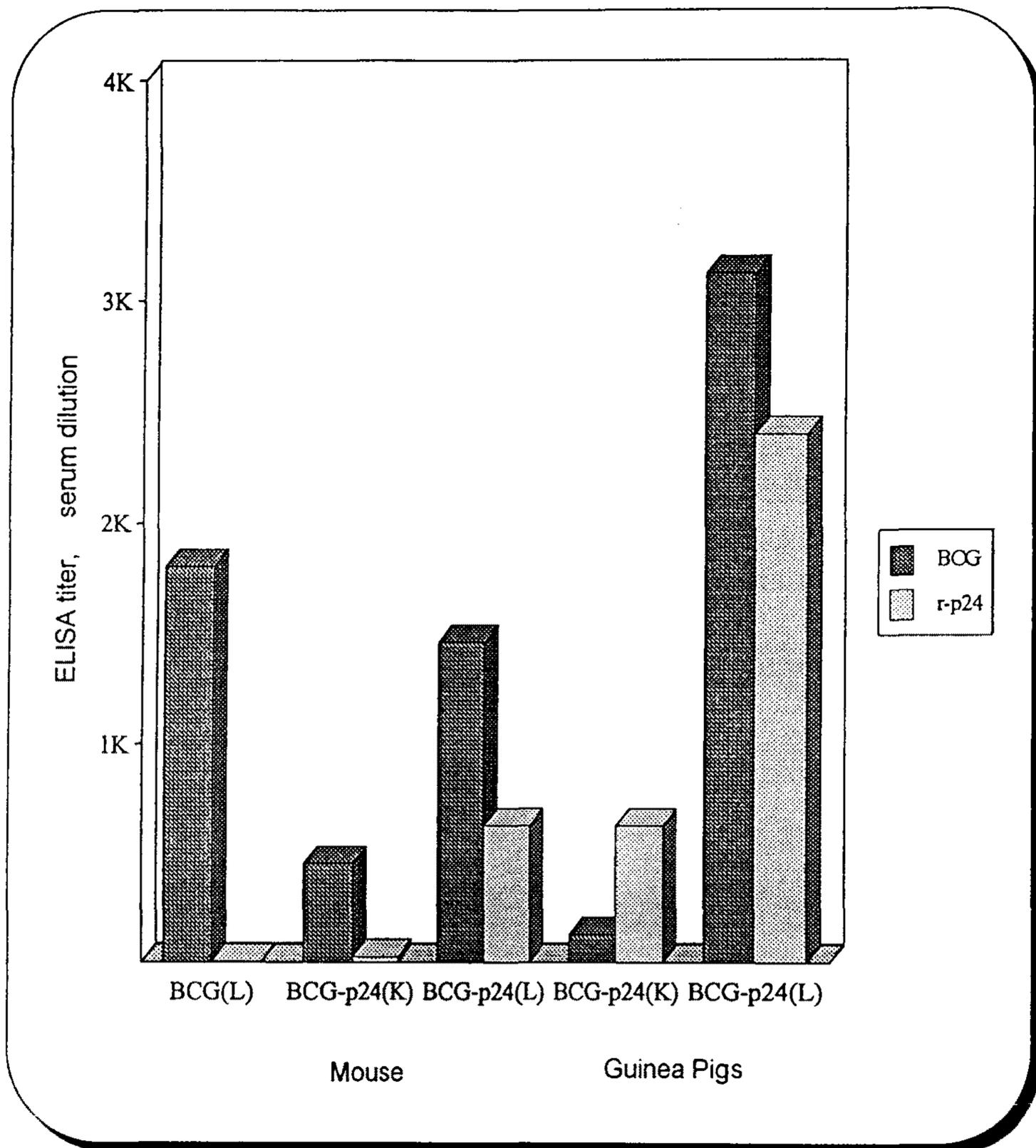


Fig. 18 Induction of humoral immunity by rBCG in mice and guinea pigs. Serum antibody titers were determined by BCG-extract-coated (black bar) and r-p24-coated (white bar) ELISA. The results are expressed as the maximum dilution rates which keep the OD values above the mean \pm 4SD. Each rectangular bar indicates the average value of the maximal dilution rates of the sera obtained from the mice (left 3 groups) or guinea pigs (right 2 groups) immunized with the same antigens.

제 4장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도

제 1절. 1차년도 연구목표 및 달성도

연구목표 : Poliovirus SabinI 을 이용한 vaccine vector 개발
달성도 : Sabin strain 의 cDNA를 유전자 조작하여 multiple cloning site와 3C-protease cutting site를 갖는 재조합 poliovirus를 생산하는데 성공하였다. 처음 유전자 조작으로 합성한 3가지 재조합 plasmid (pTZ-PVS-m, -2m, -2m/1)는 transfection실험에서 실패하였으나 그 후 합성한 pTZ-PVS-3m과 -4m 은 HeLa cell에 transfection 하였을 때 progeny virus를 생산 하였으며 이 재조합 poliovirus는 10대 이상 계대배양 하여도 새로 도입한 sequence에 변화없이 안정하였으며 항원성 및 증식력도 야생형 Sabin strain과 비슷하게 유지하였다. PVS-3m, PVS-4m을 viral vector로 사용할 수 있으므로 일차년도 연구목표는 달성 되었다.

제 2 절. 2차년도 연구목표 및 달성도

연구목표 : Vector를 이용한 chimeric virus 합성
달성도 : pTZ-PVS-3m vector에 HIV-1 p24 유전자를 cloning 하여 Hela cell에 transfection 하고 chimeric virus를 생산하는 데 성공하였다. 이 chimeric virus는 감염된 세포에

서 증식시 p24 단백을 매우 효과적으로 발현 함을 western blot 실험으로 확인 하였다. 이 결과로 보아 본 과제를 통해 새로이 개발한 재조합 poliovirus vector는 live viral vaccine 개발의 vector로 사용 할 수 있으며 이 경우 생산된 chimeric virus는 경구 투여가 가능하고 부작용이 전혀 없으며 무엇보다도 mucosal immunity 유도능이 상당히 뛰어날 것으로 기대 된다.

제 3절. 대외 기여도

본 과제는 AIDS vaccine 개발을 위한 일단계 기초 연구로 우선 poliovirus vaccine strain을 이용한 viral vector 개발에 목표를 두고 진행되었다. 지난 2년간의 연구를 통해 poliovirus Sabin type 1 cDNA를 유전자 조작 하여 vaccine 유전자를 쉽게 cloning 하고 clone 된 유전자 발현시 viral protease에 의해 vaccine 단백질이 autoprocessing 될 수 있도록 설계한 pTZ-PVS-3m 및 pTZ-PVS-4m vector를 개발 하였다. 이 vector에 HIV-1 p24 유전자를 cloning 하여 chimeric virus를 합성하고 chimeric virus 증식시 감염된 세포에서 p24가 효과적으로 발현되는 것을 확인함으로써 이 vector의 실용가능성을 입증하였다. 앞으로 본 viral vector는 여러 가지 vaccine 개발의 vector로 사용될 수있으리라 기대한다. 특히 subunit vaccine 의 낮은 면역유도능, mucosal immunity 유도미약 등, 여러 가지 문제점을 극복 할 수 있어

subunit vaccine을 대체 할 수 있을 뿐 아니라, 중요한 vaccine가능 단백질지만 원핵세포에서 발현이 어려워 vaccine 개발이 힘든 경우도 이 vector에 cloning 하면 chimeric virus 증식시 감염된 진핵세포에서 vaccine 단백질 발현되어 감염부위에서 점막면역뿐 아니라 전신면역을 유도함으로 vaccine 으로서 최대의 효과를 나타낼 수 있으므로 앞으로 여러 vaccine 개발에 크게 기여 할 수 있을 것으로 기대 된다.

제 5장 : 연구개발 결과의 활용계획

지난 2년간 1단계 연구에서 개발한 Sabin vector를 이용하여, 2단계 연구에서는 HIV-1 vaccine 유전자로 광범위한 HIV-1 strain에 대해 중화항체를 유도 할 수 있는 multivalent V3-concatamer를 발현하는 chimeric virus를 생산 하고자 한다. 이를 약술하면 AIDS 진행에 따라 dominant 하게 나타나는 HIV-1 env sequence를 기초로 principal neutralizing domain을 포함하는 env의 V3 부분을 유전자 조작하여 multivalent 한 V3를 만들고 이들을 서로 연결하여 concatamer를 합성한다음 1 단계에서 개발한 vector에 cloning 하여 multivalent V3-concatamer를 발현하는 chimeric virus를 생산하고 이를 poliovirus receptor를 발현 하는 transgenic mice에 면역시켜 안정성, 안전성, 면역유도 능 여러 HIV-1mutant에 대한 중화항체 생산능, 항혈청의 HIV-1 증식 억제정도 등을 조사함으로 이 chimeric virus의 AIDS vaccine 가능성을 알아보하고자 한다. 또한 이외에도 본 viral vector에 현재 연구가 한창인 virus성 질환(Hepatitis, Papilloma 등) 에 대한 vaccine 유전자를 cloning 하여 chimeric virus를 합성하고 이들의 vaccine 효능을 밝힘으로 vector의 실용가능성을 더욱 확고히 하고자 한다..

제 6장 참고문헌

1. Andino, R., D. Silvera., S.D. Suggett., P.L. Achacoso., E.J. Miller., D. Baltimore. and M. Heinberg. 1994. Engineering poliovirus as a vaccine vector for the expression of diverse antigens. *Science*. **265** : 1448-1451.
2. Ansardi, DC., Z. Moldoveanu, D.C. Porter, D.E. Walker, R.M. Conry, A.F. LoBuglio, S. McPherson, and C.D. Morrow 1994. Characterization of Poliovirus Replicons encoding Carcinoembryonic antigen. *Cancer Res*. **54** : 6359-6364.
3. Bae, Y.S., and J.W. Yoon. 1989. Genomic differences between the diabetogenic and nondiabetogenic variants of encephalomyocarditis virus. *Virology* 170:282 -289.
4. Bae, Y.S., R. Pon., D. Giron. and J.W. Yoon. 1990. Two amino acids, Phe-16 and Ala-776, on the polyprotein are most likely responsible for the diabetogenicity of encephalomyocarditis virus. *J.Gen.Virol.* **71** : 639-645
5. Bae, Y.S., Y. Kang., E. Otschuka. and J.W.Yoon. 1993. Development of a recombinant RNA technique for the construction of chimeric RNA with a long poly(C) tract. *Nucleic Acid Res.* **21** : 2713-2718
6. Burke, K.L., G. Dunn., M. Ferguson., P.D. Minor. and J.W. Almond. 1988. Antigen chimeras of poliovirus as potential new vaccines. *Nature*

332 : 81-82.

7. Cameron, P.U., P.S. Freudenthal., J.M. Barker., S. Gezelter., K. Inaba. and R.M. Steinman. 1992. Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type 1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD₄⁺ T cells. *Science* **257** : 383-387

8. Cease, K.B. and J.A. Verzofsky. 1994. Toward a vaccine for AIDS: The emergence of immunobiology-based vaccine development. *Ann.Rev.Immunol.* **12** : 923-989

9. Chakrabarti, S., M. Robert-Guroft., F. Wang-stal., RC. Gallo. and B. Moss. 1986. Expressing of HTLV-III envelope gene by a recombinant vaccinia virus. *Nature* **320** : 535-537

10. Chanda, P.K., R.J. Natuk., B.B. Mason., B.M. Bhat., L. Greenberg., S.K. Dheer., K.L.Molnm-Kimber., Mizntanis, M.D.Lubeck., A.R.Davis. and P.P.Hung. 1990. High level expression of the envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus type 1 in the presence of rev gene using helper independent adenovirus type 7 recombinant. *Virology* **175** : 535-547.

11. Choi, W.S., R. Pal-Ghosh. and C.D. Morrow. 1991. Expression of human immunodeficiency virus type 1(HIV-1) gag,pol and env proteins from chimeric HIV-1-poliovirus mini replicons. *J.Virol.* **65** : 2875-2883

12. Cooney, E.L., A.C. Collier., P.D. Greenberg., R.W. Coombs., J. Zarling., D.E. Arditti., M.C. Hoffman., S.L. Hu. and L. Corey. 1991. Safety of and immunological response of a recombinant vaccinia virus vaccine expressing HIV envelope glycoprotein. *Lancet* **337** : 567-572
13. Dedieu, J-F., J. Ronco., Van der S. Werf., J.M. Hogel., Y. Henin. and M. Girad. 1992 Poliovirus chimeras expressing sequences from the principal neutralizing domain of Human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **66** : 3161-3167.
14. DiMichele, S., P. Reilly, N. Mattion, S. Fantini, E. Camposano, J. Croweley, and C. Weeks-Levy. 1995. Characterization of recombinant poliovirus expressing the pre-S2 region of Hepatitis B surface antigen. *Vaccine* **95** : pp 293-297, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
15. Dougherty, W.G. and B.L. Semler. 1993. Expression of virus-encoded proteinases ; Functional and structural similarities with cellular enzymes. *Microbiological.Rev.* **57** ; 781-822
16. Earl, P.L., M. Robert-Gunoff., T.J. Matthews., K. Krohn., W.T. London. and B. Moss. 1989. Isolate and group-specific immunity to the envelope protein of human immunodeficiency virus induced by a live recombinant vaccinia virus in macaques. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **5** : 23-32.
17. Embreston, J., M. Zupancis., J.L. Ribas., A. Burk., P. Racz., K. Tenner-Racz. and A.T. Hasse. 1993. Massive covert infection of helper T

cells and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS.

Nature **362** : 359-362

18. Evans, D.J., J. McKeating., J.M. Mervin., K.L. Burke., K. Katrak., A. John., M. Ferguson., P.D. Minor., R.A. Weiss. and J.W. Almond. 1989 An engineered poliovirus chimera elicits broadly reactive HIV-1 neutralizing antibodies. *Nature* **339** : 385-389.

19. Fauci, A. 1993. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: Implication for therapy. *Science* **262** : 1011-1018

20. Fossum, S. 1988. Lymph-borne dendritic leukocytes do not recirculate, but enter the lymph node paracortex to become interdigitating cells. *Scand.J.Immunol.* **27** : 97-105

21. Gallichar, W.S., D.C. Johnson., F.L. Graham. and K.L. Rosenthal. 1993. Mucosal immunity and protection after intranasal immunization with recombinant adenovirus expressing herpes simplex virus glycoprotein B. *J.Infect.Dis.* **168** : 622-629

22. Giavedoni, L.D., L.Jones., M.B. Gardner., H.L. Gibson. P.J. Ba. and T. Yilmaz. 1992. Vaccinia virus recombinants expressing chimeric proteins of human immunodeficiency virus and γ -interferon and attenuated for nude mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** : 3409-3413.

23. Hu. S.L., S.G. Kosowski. and J.M. Daulton. 1986. Expression of

AIDS virus envelope gene in recombinant vaccinia virus. *Nature* **320** : 537-540.

24. Jenkins, O., J. Cason, K.L. Burke, D. Lunney, A. Gillen, D. Patel, D.J. McCance, J.W. Almond. 1990. An antigen chimera of poliovirus induces antibodies against human papilloma virus type 16. *J. Virol.* **64** :1201-1206.

25. Kean, KM., N. Teterina, and M. Girard. 1990. Cleavage specificity of the poliovirus 3C protease is not restricted to Gln-Gly at the 3C/3D junction. *J. Gen. Virol.* **71** : 2553-2563.

26. Kohara, M., S. Abe., S. Kuge., B.L. Semler., T. Komatsu., M. Arita., H. Itoh., A. Nomoto. 1986. An infectious cDNA clone of the poliovirus Sabin strain could be used as a stable repository and inoculum for oral polio live vaccine. *Virology.* **151** : 21-30.

27. Koike, S., C. Taya., T. Kurata., S. Abe., I. Ise., H. Yonekawa. and A. Nomoto. 1991. Transgenic mice susceptible to poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88** : 951-955.

28. Kott, W.C. 1994. The next steps toward a global AIDS vaccine. *Science* **266** : 1335-1337

29. Langhoff, E., E.F. Terwilliger., H.J. Bos., K.H. Kallender., M.C. Pozvansky., O.M.L. Bacon. and W.A. Haseltine. 1991. Replication of human

immunodeficiency virus type 1 in primary dendritic cell cultures.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA. **88** : 7998-8002

30. Lehner, T., L.A. Bergmeier., C. Panagiotidi., L. Tao., R. Brooks., L.S. Klavinskis., P. Walker., J. Walker., R.G. Ward., L. Hussain., A.J.H. Gearing. and S.E. Adams. 1992. Induction of mucosal and systemic immunity to a recombinant simian immunodeficiency viral protein. *Science* **258** : 1365-1369

31. Liu, L.M. and G.G. Macpherson. 1993. Antigen acquisition by dendritic cells: Intestinal dendritic cells acquire antigen administered orally and can prime native T cells in vivo. *J.Exp.Med.* **177** : 1299-1307

32. London, S.D., D.H. Rubin. and J.J. Cebra. 1987. Gut mucosal immunization with reovirus serotype 1/L stimulates virus-specific cytotoxic T cell precursors as well as IgA memory cells in Peyer's patches. *J.Exp Med.* **165** : 830-847.

33. Mattioli, N.M., P.A. Reilly, S.J. DiMichele, J.C. Crowley, and C. Weeks-Levy. 1994. Attenuated poliovirus strain as a live vector: Expression of region of Rotavirus outer capsid protein VP7 by using recombinant Sabin 3 viruses. *J. Virol.* **68** : 3925-3933

34. Max, P.A., R.W. Compans., A. Gettie., J.K. Staas., B.M. Gilley., M.J. Mulligan., G.V. Yamshchikov., D. Chen. and J.H. Eldridge. 1993. Protection against vaginal SIV transmission with microencapsulated vaccine. *Science*

260 : 1323-1327

35. McGhee, J.R., J. Mestecky., M.T.Dertzbaugh., J.H. Eldridge., M. Hirasawa. and H. Kiyono. 1992. The mucosal immune system;from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* **10** : 75-88

36. Meitin, C.A., B.S. Bender. and P.Q. Small. 1991. Influenza immunization;intranasal live vaccine recombinant contrasted with parental inactivated vaccine.*Vaccine* **9** : 751-756

37. Miller, C. and M.B. Gardner. 1991. AIDS and mucosal immunity;usefulness of the SIV macaque model of genital mucosal transmission. *J.AIDS* **4** : 1169-1172

38. Miller, C.J., N.J. Alexander., S. Sutjipto., A.A. Lackner., A. Gettie., A.G. Hendrick., L.J. Lowenstein., M. Temings. and P.A. Marx. 1989. General mucosal transmission of Simian immunodeficiency virus;Animal model for heterosexual transmission of human immunodeficiency virus. *J.Virol.* **63** : 4277-4284

39. Munoz, E., A.M. Zubiaga., M. Merrow., N.P. Santer. and B.T. Huber. 1990. Cholera toxin discriminates between T helper 1 and 2 cells in T cell receptor-mediated activation;Role of cAMP in T cell proliferation. *J.Exp.Med.* **172** : 95-103

40. Murdin, AD., H. Su, S. Manning, M.H. Klein, M.J. Parnell, and H.D.

Caldwell. 1993. A poliovirus hybrid expressing a neutralization epitope from the Major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* is highly immunogenic. *Infect. Immun.* **61** :4406-4414.

41. Natuk,R.J., P.A. Chanda., M.D. Lubeck., A.R. Davis., J. William., R. Hjorth., M.S. Wade., D.M. Bhat., S. Mitzatani., S. Lee., J. Eichberg., R.C. Gallo., P.P. Hung. and M. Robert-Gwoff. 1992. Adenovirus-human immunodeficiency virus (HIV) envelope recombinant vaccines elicit high titered HIV-neutralizing antibodies in the dog model. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **89** :7777-7781.

42. Ofit, P.A. and Kl. Dudzik. 1989. Rotavirus specific cytotoxic T lymphocyte appear at the intestinal mucosal surface after rotavirus infection. *J.virol* **63** : 3507-3512.

43. Pantaleo, G., C. Graziosi., J.F. Demanest., L. Butini., M. Montroni., C.H. Fox., J.M. Orenstein., D.P. Kotler. and A.S. Fauci. 1993. HIV infection is active progressive in lymphoid tissue during the clinical latent stage of disease. *Nature* **362** : 355-358

44. Patterson, S. and S.C. Knight. 1987. Susceptibility of human peripheral blood dendritic cells to infection by human immunodeficiency virus. *J.Gen.Virol.* **68** : 1177-1180

45. Patterson, S., J. Gross., P. Bedford. and S.C. Knight. 1991. Morphology and phenotype of dendritic cells from peripheral blood and

their productive and nonproductive infection with human immunodeficiency virus type 1. *Immunol.* **72** : 361-367

46. Porter, D.C., D.C. Ansardi. and C.D. Morrow. 1995. Encapsidation of poliovirus replicons encoding the complete HIV-1 gag gene by using a complementation system which provide the P1 capsid protein in trans. *J.Virol.* **69** : 1548-1555.

47. Porter, D.C., D.C. Ansardi., W.S. Choi. and C.D. Morrow. 1993. Encapsidation of genetically engineered poliovirus minireplicons which express human immunodeficiency virus type 1 gag and pol proteins upon infection. *J.Virol.* **67** : 3712-3719

48. Porter, DC., L.R. Melsen, R.W. Compans, and C.D. Morrow. 1996. Release of virus-like particles from cells infected with poliovirus replicons which express human immunodeficiency virus type1 gag. *J. Virol.* **70** : 2643-2649.

49. Racaniello, V.R., and D. Baltimore. 1981. Cloned poliovirus complementation cDNA is infection in mammalian. *Science* **214** : 916-918.

50. Ren, R., F. Costantini., E.J. Gorgact., J.J. Lee. and V.R. Racaniello. 1990. Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor : A new model for poliomyelitis. *Cell* **63** : 353-362.

51. Rose, C., W. Andrew, M. Ferguson, J. McKeating, J. Almond, and D. Evans. 1994. The construction and characterization of poliovirus antigen chimeras presenting defined regions of the human T lymphocyte marker CD4. *J.Gen. Virol.* **75** :969-977.
52. Shen, L., Z.W. Chen., M.D. Miller., V. Stall. and G.P. Mazzara., D.L. Panicali. and N.L. Letvin. 1991. recombinant viral vaccine-induced SIV-specific CD⁺₈ cytotoxic T lymphocytes. *Science* **252** : 440-443.
53. Stingl, G., K. Rappersberger., E. Tschachler., S. Gartner., V. Groh., D.L. Mann., K. Wolff. and M. Popovic. 1990. Langerhans cells in HIV-1 infection. *J.Am.Acad.Dermatol.* **22** : 1210-1217
54. Takahashi, H., J. Cohen., A. Hosmalin., K.B. Cease., R. Houghten., J. Cornette., C. DeLisi., B. Moss., R.N. Gernain. and J.A. Berzofsky. 1988. An immunodominant epitope of the HIV-1 gp160 envelope glycoprotein recognized by class I MHC molecule-restricted murine cytotoxic T lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **85** : 3105-3109.
55. Tartaglia,J., M.E. Perkus., J. Taylor., E.K. Norton., J.C. Audonnet., W.I.Cox., S.W. Davis., J. Van der Hoeven., B. Meignier., M. Riviere., B. Languet. and E. Paolette. 1992. A highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* **188** : 217-232.
56. Top, F.H., E.L. Buescher., W.H. Bancroft. and P.K. Russel. 1971. Immunization with live type 7 and 4 adenovirus vaccines vaccines .

II .Antibody response and protective effect against acute respiratory disease due to adenovirus type 7. *J.Infect.Dis.* **124** : 155-160.

57. Tschachler, E., V. Groh., M. Popovic., D.L. Mann., K. Konrad., B. Safai., L. Eron., F.M. Veronese., K. Wolff. and G. Stingl. 1987. Epidermal langerhans cells-A target for HTLVIII/LAV infection. *J.Invest.Dermatol.* **88** : 233-237

58. Van der Welf,S., J. Bradley., E. Wimmer., F.W. Studier. and J.J. Dunn. 1986. Synthesis of infectious poliovirus RNA by purified T7 RNA polymerase. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **83** : 2330-2334

59. Wilson,A.D., A. Robinson, L. Irons. and C.R. Stokes. 1993. Adjuvant action of cholera toxin and pertussis toxin is the induction of IgA antibody responses to orally administered antigen. *Vaccine* **11** : 113-118